

ヒト正常線維芽細胞の試験管内
加齢と酸素毒性に関する研究

1999

水田 悠三

目次

序論	1	
第1章	ヒト正常線維芽細胞の試験管内加齢に伴う高圧酸素感受性の変化	12
第1節	ヒト正常線維芽細胞の試験管内老化現象	12
第2節	高圧酸素のヒト正常線維芽細胞に及ぼす影響	13
第3節	試験管内加齢に伴う高圧酸素感受性の変化	25
第4節	考察	25
第2章	高圧酸素曝露による試験管内細胞老化の促進	32
第1節	高圧酸素曝露による試験管内老化の促進	32
第2節	継代後期細胞の高圧酸素曝露による老化の促進	35
第3節	考察	38
第3章	高圧酸素障害の修復能の細胞加齢に伴う変化	41
第1節	高圧酸素によるコロニー形成能の障害の回復	41
第2節	高圧酸素によるDNA合成の障害の回復	43
第3節	高圧酸素障害の回復に及ぼす阻害剤の影響	45
第4節	考察	47

第 4 章	細胞内 GSH 濃度と酸素毒性 - - - - -	50
第 1 節	細胞内 GSH 濃度の低下とその高圧酸素毒性 への影響 - - - - -	50
第 2 節	細胞内 GSH 濃度の増大とその高圧酸素毒性 への影響 - - - - -	52
第 3 節	考察 - - - - -	55
第 5 章	細胞内 GSH 濃度の試験管内老化に及ぼす影響 - -	61
第 1 節	細胞内 GSH 濃度低下の試験管内老化に及ぼ す影響 - - - - -	61
第 2 節	細胞内 GSH 濃度増大の試験管内老化へ及ぼ す影響 - - - - -	64
第 3 節	考察 - - - - -	64
第 6 章	総括的考察 - - - - -	70
総括 - - - - -		76
掲載雑誌目録 - - - - -		81
謝辞 - - - - -		82
文献 - - - - -		83

略語表

PD	Population doubling
SOD	Superoxide dismutase
GSH	Reduced glutathione (γ -glutamyl-cysteinylglycine)
GSSG	Oxidized glutathione
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
DDC	Diethyldithiocarbamate
TIG	Tokyo metropolitan institute of gerontology
WI	Wister institute
BME	Basal Medium Eagle's
DME	Dulbecco' modified Eagle's medium
TdR	Thymidine
TCA	Trichloroacetic acid
6-OHDA	6-Hydroxydopamine
G ₁	Gap 1
S	Synthesis
G ₂	Gap 2
M	Mitosis
EMS	Ethyl methanesulfonate
MNNG	N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine
PLDR	Potentially lethal damage repair
Leu	Leucine

β -araA β -Arabinoguanosyladenine
BSO L-buthionine-R,S-sulfoximine
AC N-acetylcysteine

(序論)

生き物はなぜ老化するか？ 寿命はどの様に決定されるのか？ という問題は生命を考える上で基本的でかつ最も難しい問題の一つであると思われる。近年、科学のメスが入れられてきたが、多くの未解決の問題を残している。ヒトでは種々の老性変化が知られている。皮膚では表皮の萎縮および真皮の弾力の低下であり¹⁾、血管では血管の弾性低下や動脈の内膜が肥厚し動脈硬化性変化が見られる²⁾。目ではレンズの白濁が起こる白内障の症例が増大する³⁾。骨では骨の萎縮が見られ、骨粗しょう症と呼ばれる骨の密度の低下を起こす症例が増大する⁴⁾。種々の臓器、例えば、脾臓⁵⁾、肝臓⁶⁾、腎臓⁷⁾、膵臓⁸⁾や脳⁹⁾の重量が減少する。これらの臓器の重量の減少は各臓器を構成する細胞数の減少であることが明らかにされている。各臓器を構成する細胞の老性変化も見いだされている。リポフスチン(老化色素)は老化個体における、種々の臓器； 心臓¹⁰⁾や脳¹¹⁾、肝臓¹²⁾、の細胞内に見いだされる。肝臓の細胞では、ミトコンドリアの増量¹³⁾や細胞容積の増大が見られ⁶⁾、実験動物においても同様の成績が得られている¹⁴⁾。老化動物における種々の細胞の増殖能の低下が明らかにされている。イソプロテレノール注射後の顎下腺細胞¹⁵⁾、肝臓の部分切除後の残余肝細胞¹⁶⁾、一側腎摘除後の残余腎細胞¹⁷⁾やTリンパ球¹⁸⁾の増殖が加齢と共に低下している。また老化個体の臓器に細胞の変性像が見られることから、加齢に伴う臓器の構成細胞数の減少は、細胞死とそれを補うべき細胞増殖の能力の低下すなわち細胞の老化に起因されよ

う。Weismannは細胞の老化が個体の老化の原因であるとする仮説を提唱した¹⁹⁾。細胞の老化が臓器の機能を低下させ、かつ予備力を低下させ種々のストレスに対する抵抗性を低下させ個体の死、すなわち寿命を引き起こすことは十分考えられることであるが、その因果関係は証明されていない。各臓器を構成する細胞がそれぞれ固有の加齢過程を経て自律的に細胞の老化が起きるのか、それとも、細胞を取り巻く環境（神経、体液、あるいは他の臓器との相互作用）により細胞の老化が起こるのかは明かではない。しかしヒトの臓器の組織像の観察や、実験動物の生体内での研究から結論を出すことは容易ではない。

Hayflickらはヒトの正常の組織から取り出した細胞は試験管内で連続的に培養を続けるとついには増殖を停止することを見だし、細胞老化が試験管内で現れたと解釈した^{20, 21)}。生体内での種々の細胞外環境の影響を受けずに細胞の固有の老化現象を研究する系としてその後多くの研究がなされてきた²²⁾。この試験管内細胞老化現象は、肺線維芽細胞^{20, 21)}、皮膚線維芽細胞²³⁾、血管平滑筋細胞²⁴⁾、血管内皮細胞²⁵⁾、グリア細胞²⁶⁾、リンパ球T細胞²⁷⁾、骨細胞²⁸⁾、レンズ細胞²⁹⁾、皮膚角化細胞³⁰⁾や副腎皮質細胞³¹⁾などのヒトの種々の組織の細胞で見いだされている。また、ニワトリ³²⁾、ラット³³⁾、ハムスター³⁴⁾、カンガルー³⁵⁾などの種々の動物の細胞でも試験管内細胞老化現象が見つかっており（動物によっては、増殖を停止した後、形質転換を起こし無限増殖性を獲得する場合もある）普遍的な現象と考えられている。ヒトでは細胞供与者の年齢と試験管内寿命とが負の相関を示し^{36, 37)}また老性変化が早く現

れ寿命が短い種々の早老症の患者からの細胞の試験管内寿命が短いことが明らかにされている³⁶⁾。また種々の動物の個体の最大寿命と、その細胞の試験管内寿命が相関していることも示され³⁸⁾、この試験管内細胞老化が個体における老化現象と関係があることが示唆されている。Hayflickをはじめ多くの研究者が用いているヒト胎児肺由来線維芽細胞では肺組織からの細胞を初代培養するとその後、図1に示すように、活発な細胞増殖が続く。連続的に継代培養を続けると細胞集団倍加数 (PD; 細胞集団でみた分裂回数) 50ないし60 (初代培養時1個の細胞が 2^{50} ないし 2^{60} 個になる) から細胞増殖が低下し、PD56ないし68で細胞増殖が停止する。図1aは培養日数に対しPDをプロットしたもので、図1bはPDに対して継代1週間後の細胞数をプロットしたものである。この細胞増殖が停止した時点のPDを細胞の寿命と呼ぶ。また、まだ継代回数が少なくPDが小さい細胞を継代前期細胞 (若細胞、図2a)、継代を重ねたPDの大きい細胞を継代後期細胞 (老細胞) と呼び、特に細胞増殖が低下し継代が困難になった時期の細胞を老衰期の細胞 (図2b) と呼ぶ。老衰期の細胞の特徴は (1) DNA合成の低下³⁹⁾、(2) 細胞容積の増大⁴⁰⁾および (3) リポフスチン (老化色素) 様の自家蛍光物質の細胞内での蓄積⁴¹⁾などである。老化個体の組織の細胞は増殖率の低下、DNA合成の低下、細胞容積の増大そしてリポフスチンの蓄積など種々の点で試験管内で加齢した細胞と類似性がある⁴²⁾。試験管内加齢に伴う種々の酵素活性やその他の細胞構成成分の変動を分析した莫大な研究報告があるが細胞増殖の低下に関かわるもの以外では大きく特徴的な変化を示すものはほとんど見いださ

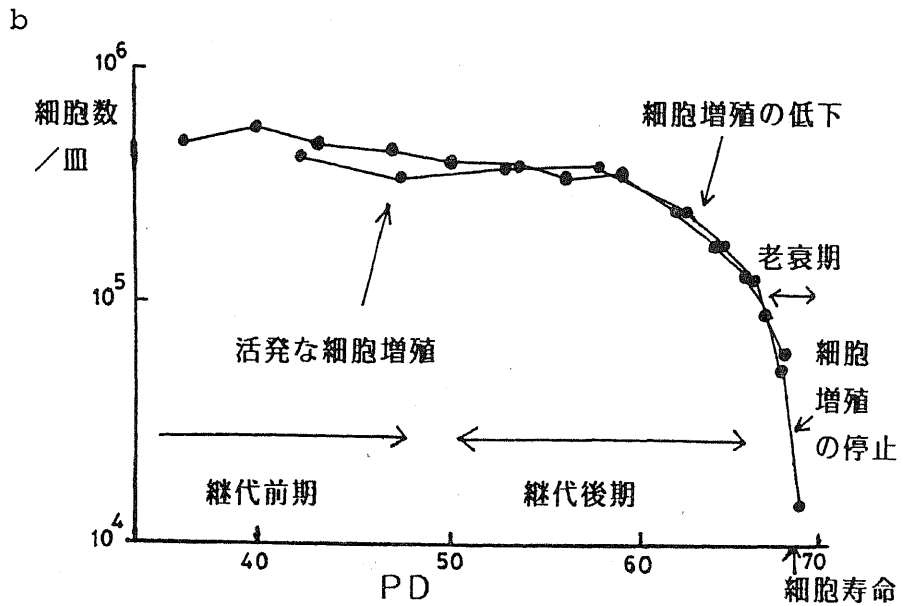
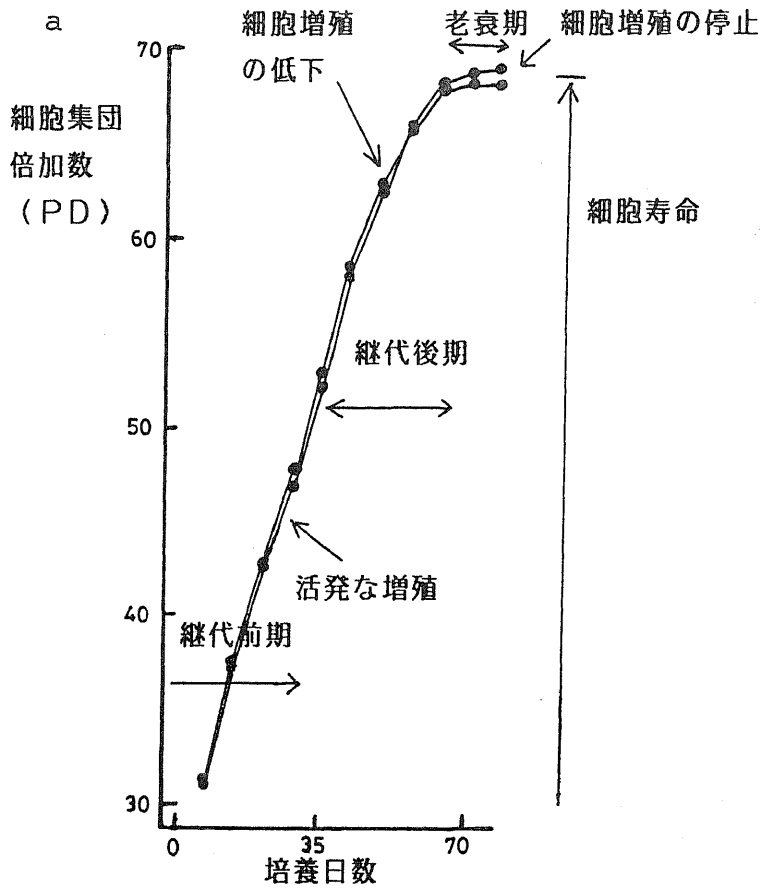
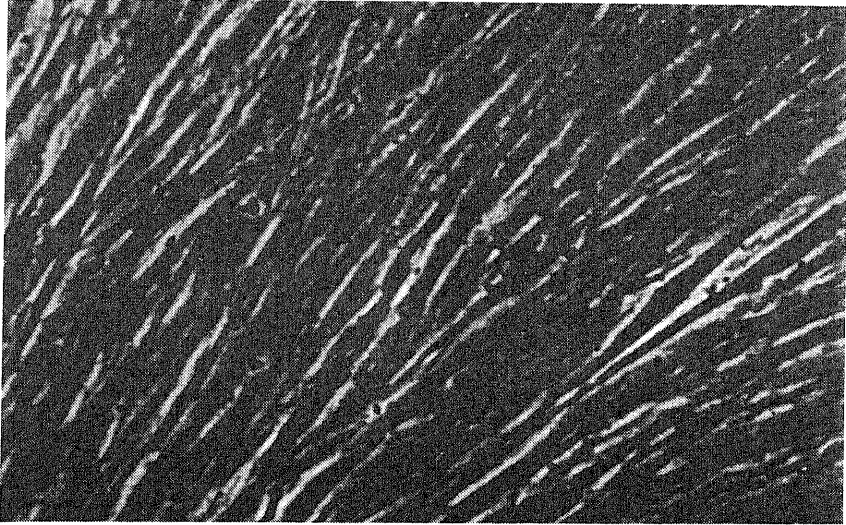


図 1 ヒト正常線維芽細胞の試験管内加齢

a



b

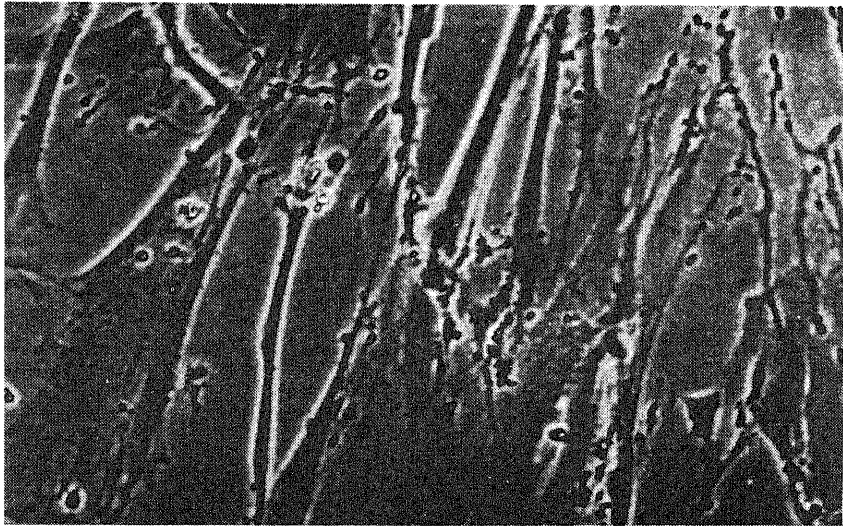


図 2 ヒト正常線維芽細胞の顕微鏡像 a:PD35、 b:PD55

れてなく²²⁾、試験管内老化の機構は全く不明であった。

老化の機構を説明するいくつかの仮説が提出されている⁹⁾。

(1) プログラム説⁹⁾：発生や成長、成熟の過程が遺伝子のプログラムにより規定されているように、加齢の速度や寿命を決定する遺伝子（群）（老化遺伝子）が存在し、その発現により種々の機能低下がもたらされるとする。この説に対する一つの反論はこの老化遺伝子に対する突然変異を起こした不老不死の変異個体が存在するかという点である。いま一つの反論は種の繁殖能に関する遺伝子は突然変異を受けても種の中に保持され、あるいは進化して行くが、繁殖を終えた後の生存時間（寿命）を決める、繁殖に無関係な遺伝子が種の中に保持される理由がないというものである。

(2) 誤り破綻（エラーカタストロフィー）説⁴³⁾：mRNAの情報をタンパク質に翻訳する過程での誤り（異なるアミノ酸の取り込み）が起き、生成された誤ったタンパク質が翻訳過程を誤り易くして行き、この悪循環がついには細胞機能の障害にまで至らせるというものである。一つの反論は動物の組織において老若個体間に⁴⁴⁾、また試験管内で加齢した老細胞と若細胞との間に⁴⁵⁾ほとんどのタンパク質の2次元電気泳動パターンに差が見いだせないことである。また試験管内で加齢した老細胞の中で作らせたウイルスのタンパク質に異常が見いだせないこと⁴⁶⁾、また培養液にエチオニンなどを添加し異常タンパク質を作らせても試験管内加齢に影響が見られないこと⁴⁷⁾などもこの説を支持しない。

(3) 体細胞突然変異説⁹⁾：体細胞におけるDNAの塩基の変化が

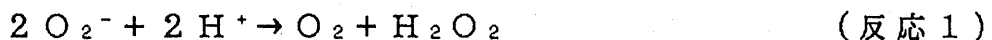
DNA合成の誤りなどで引き起こされ細胞の機能障害に至るというものである。実験的に多倍体にさせた培養細胞の寿命は通常の2倍体細胞のものと同様であること⁴⁸⁾はDNAに傷がつく速度(4倍体なら2倍体の半分のはず)は加齢の速度とは無関係であることを示す。またDNAの塩基変化を十分起こす線量の紫外線⁴⁹⁾またはエチルメタンサルホン酸(EMS)およびN-メチル-N'-ニトロニトロソグアニジン(MNNG)⁵⁰⁾を培養細胞に頻回処理しても試験管内での寿命に影響がみられなかったことなどはこの説に不利である。

その他、クロスリンク説や老廃物蓄積説などがあるが、その中で最も注目すべき説がフリーラジカル説と思われる。

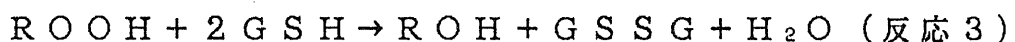
(4) フリーラジカル説: 通常の酸素代謝にともなって生成する酸素フリーラジカル(活性酸素)が生体構成成分に障害を与え、その蓄積が老化を引き起こすというものであり、Harmanにより1956年に提唱された⁵¹⁾(図3)。

地球上に酸素が増大してきた20億年前酸素は生き物を構成する物質を酸化する脅威の分子であったはずである。嫌気性細菌の存在はこの事を物語っている。生き物が酸素を利用して効率よくエネルギーを得て多様な機能を獲得して行くには、同時に生体構成成分を酸素による酸化から守るための機構を進化させる必要があった。酸素による生体構成成分の酸化は、酸素が活性酸素に変換されて作用すると考えられている。ミトコンドリア^{52,53)}やミクロゾーム⁵⁴⁾の電子伝達系やキサンチン酸化酵素⁵⁵⁾、種々のキノン類⁵⁶⁾により酸素はスーパーオキシドラジカルに変換される。過酸化水素はやはり電子伝達系⁵⁷⁾やグリコー

ル酸酸化酵素など⁵⁸⁾またスーパーオキシドラジカルの不均化反応⁵⁹⁾などにより生成される。ヒドロキシルラジカルは二価鉄などの金属と過酸化水素との反応⁶⁰⁾などにより発生する。一重項酸素は高いエネルギーに励起されたポルフィリン⁶¹⁾などにより生成する。これらの活性酸素により酵素、タンパク質中のアミノ酸残基の酸化⁶²⁾や混合ジスルフィド形成⁶³⁾、DNAの塩基の酸化⁶⁴⁾やDNA鎖の切断⁶⁵⁾また脂質の過酸化⁶⁶⁾などが引き起こされる。これらの活性酸素に対する種々の防御機構が知られ、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)はスーパーオキシドラジカルを酸素と過酸化水素に不均化させる(反応1)⁵⁹⁾。



グルタチオンペルオキシダーゼは還元型グルタチオン(GSH)を補酵素として過酸化水素や種々の過酸化物を還元する(反応2および3)⁶⁰⁾。



この反応で生成された酸化型グルタチオンはグルタチオン還元酵素にてNADPHを補酵素として還元型に変換される。GSH自身でも過酸化水素やスーパーオキシドラジカルを解毒する⁶⁸⁾。またカタラーゼも過酸化水素を水に変えるが、哺乳動物での過酸化水素の解毒においてはグルタチオン系の方が重要であることが示されている⁶⁹⁾。ビタミンA⁷⁰⁾、ビタミンC⁷¹⁾、ビタミンE⁷²⁾などの低分子物質も活性酸素からの生体の防御に関与している。また、活性酸素により受けた障害を修復する系(DNA修復)も存在することが示されており⁷³⁾、活性酸素からの防御系の一

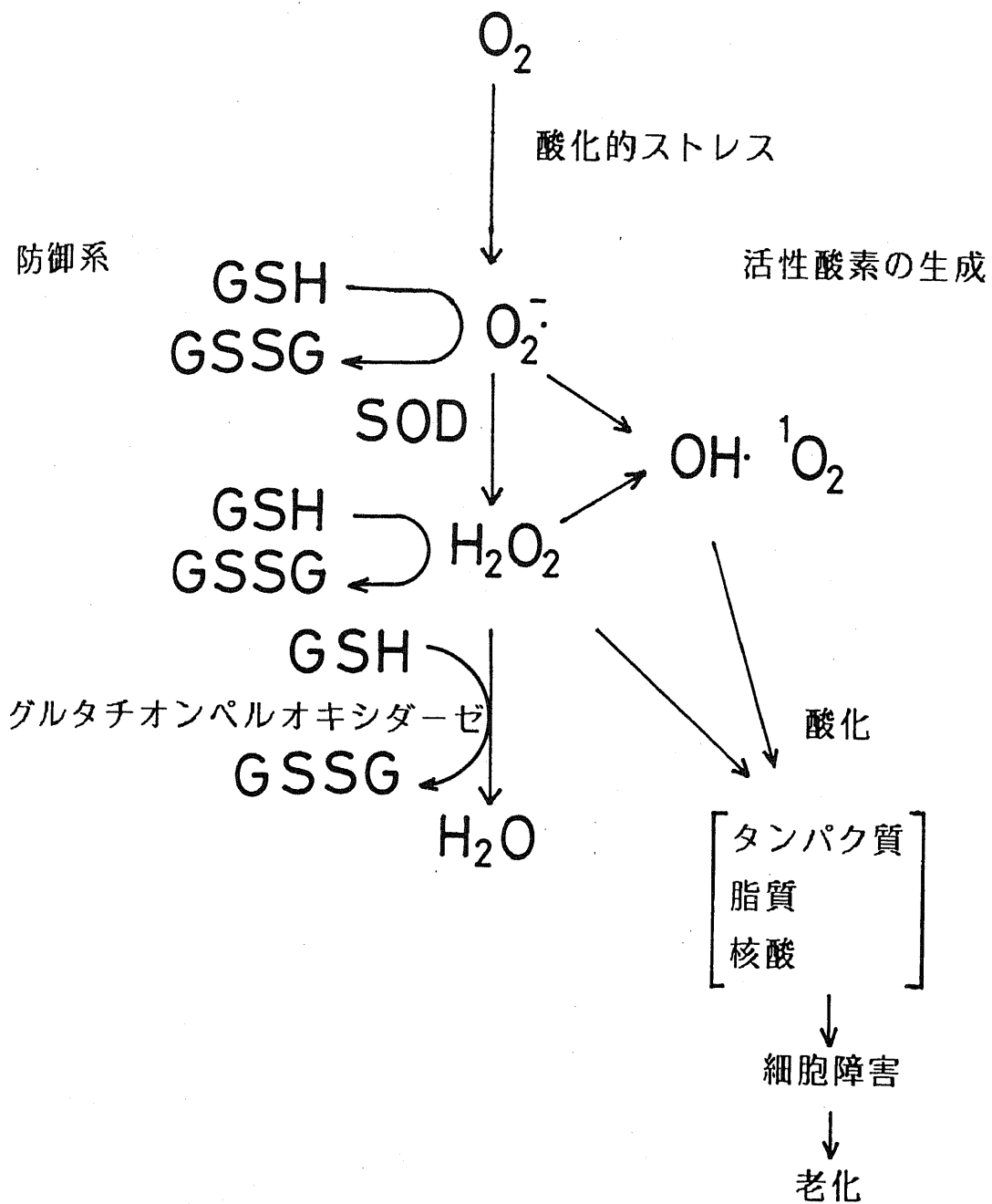


図3 活性酸素の生成と防御と老化のフリーラジカル説

つと考えられる。細胞が高い濃度の酸素に曝されるとこれらの活性酸素が細胞内に多量に生成すると考えられている⁷⁴⁾。高濃度酸素が生体に障害を与えることは酸素の発見者のPriestleyやLavoisierが18世紀に既に記述しており⁷⁵⁾、また高濃度酸素が未熟児網膜症の原因としてもよく知られている⁷⁶⁾。長期間の高濃度酸素の吸入で肺障害を起こす⁷⁷⁾。高圧酸素では神経障害が生じ⁷⁸⁾、白内障が発症する⁷⁹⁾。高酸素下でどの活性酸素種がどの生体構成成分を酸化し、それがどの程度障害の発現に関与しているかを直接評価することは現在でも難しい。SOD活性が高い大腸菌は高圧酸素に抵抗性を持つこと⁸⁰⁾、肺SOD活性が高いラットは高濃度酸素下でも障害を受けにくいこと⁸¹⁾、SOD活性を欠いた大腸菌では酸素に感受性が高いこと⁸²⁾は傍証として酸素毒性発現にスーパーオキシドラジカルが関与していることを示唆している。生理的濃度の酸素下でも活性酸素の生成が見られ⁸³⁾、生体成分(DNA)が酸化されていることも知られている⁸⁴⁾。老化のフリーラジカル説では生理的濃度の酸素の毒性すなわち通常生成している活性酸素で防御系から逃れられたものによる障害がわずかづつでも長期間蓄積し、それが老化の原因となるというものである。この仮説を試験管内細胞老化の系で検証できたという報告はまだない。本研究の目的はこの説をヒト正常線維芽細胞の試験管内老化の系で証明しようとするものである。証明するために設定した課題は、第一に細胞内に活性酸素の生成を増大させたときに老化が促進されることを確認すること、第二に細胞の活性酸素に対する防御能を増大させ、生理的濃度の酸素下で生成し防御系から逃れる活性酸素を少なくさ

せたときに老化が遅延することを確認すること、第三に逆に、細胞の活性酸素に対する防御能を低下させ、生理的濃度の酸素下で生成し防御系から逃れる活性酸素を多くしたときに老化が促進することを確認することである。細胞内で活性酸素の生成を増大させる酸化ストレスとして高圧酸素を細胞に曝露する系を用いた。これは通常濃度下の酸化ストレスをそのまま増大することが出来ると考えられるからである。活性酸素に対する防御系を増大または低下させるためには細胞のGSH濃度を変動させることによった。

第1章 ヒト正常線維芽細胞の試験管内加齢に伴う高圧酸素感受性の変化

培養ヒト正常線維芽細胞を継代し続け増殖の変化を観察し、増殖能力に限界（寿命）があることを確認した。次に、高圧酸素の細胞に与える毒性を調べた。毒性の発現に活性酸素が関与していることを確認するために、SODの阻害剤であるジエチルジチオカルバミン酸（DDC）を前処理して高圧酸素の毒性を調べ、また活性酸素の代謝に関与すると考えられているGSHの濃度の高圧酸素曝露後の変化を調べた。続いて、細胞の試験管内老化における活性酸素の関わり合いを知る手掛かりを得るために、試験管内加齢に伴う高圧酸素感受性の変化を調べた。

第1節 ヒト正常線維芽細胞の試験管内老化現象

（実験方法）

東京都老人研究所およびウイスター研究所で取られたヒト胎児（3カ月齢）肺由来正常線維芽細胞を用いた（TIG-1およびWI-38細胞）。10%ウシ胎児血清を含む基礎イーグル培地（BME）またはダルベッコ改変イーグル培地（DME）中で37℃にて二酸化炭素5%—大気95%の下で単層培養した。継代は1週間毎に0.25%トリプシン溶液を加え、細胞を剥し単細胞にした後、一定数の細胞（ 1×10^4 cells/3.5cm ϕ 皿）を新しいプラスチック培養皿に播種することによった。播種後、4日目に新しい培養液と交換した。マイコプラズマの混在のチェックはKiharaらの方法⁸⁵⁾によった。

(実験結果)

ヒト正常線維芽細胞を継代して行くと、一定の期間、活発な増殖を示すがその後、増殖が低下し、ついには増殖が停止する。図1aは培養日数に対する細胞集団倍加数(PD)を示す。TIG-1細胞ではPD約60より増殖が低下しPD68で増殖が停止した。WI-38細胞ではPD約50より増殖が低下しPD56で増殖が停止した。図1bはPDに対する、細胞播種後1週間目の細胞数を示す。TIG-1細胞ではPD約60より細胞増殖が低下しその後、急速に細胞増殖が低下して行くことが図示される。図2AはPD35のWI-38(継代前期細胞)の顕微鏡写真である。細胞は小さく、整然と並んでいる。図2BはPD55のWI-38(老衰期の細胞)で細胞は大きく、それぞれ無秩序に並んでいる。Hayflickら^{20,21)}が示した、試験管内細胞老化が確認された。

第2節 高圧酸素の培養細胞に及ぼす影響

(実験方法)

培養細胞の高圧気体の曝露は細胞を含む培養皿をパールの容器に入れ気体を1atm/5-6秒にて導入する。所定の時間曝露後、1atm/9-10秒にて気体を除く。コロニー形成はトリプシン処理により単細胞にした細胞を6cm径の培養皿に 5×10^2 または 1×10^3 個播種し8ないし12日後にメチレンブルーで細胞を染め、50細胞以上の細胞の塊を1コロニーと数える。DNA合成は培養液中に ^3H -メチルチミジン(TdR、比活性185GBq/mmol、最終濃度3.7KBq/ml)、タンパク質合成は ^{14}C -ロイシン(Leu、比活性2.2TBq/mmol、最

終濃度91KBq/ml) を添加し加温後、冷5%トリクロロ酢酸 (TCA) 10分、0.1N NaOH 20分処理により、TCA不溶画分の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。細胞周期の解析はヨウ化プロピジウム (50g/ml) にてDNAを染色した細胞をサイトフルオロメーター (FCS、日本分光) で細胞当りのDNA量を測定することによった。細胞容積の測定はコールターカウンター粒度分布計によった。SODの活性測定はHeikkilaらの方法⁸⁶⁾に従い、6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) の自動酸化を阻止する活性を測定した。トリプシンで剝してきた細胞に蒸留水を加え凍結-融解を5回繰り返し、1万 x g 20分遠心した上清を1mM EDTAを含むリン酸緩衝液 (50mM) に加え37℃、15分振とうする。6-OHDA溶液は予め窒素で通気した蒸留水に6-OHDAを $2 \times 10^{-2} M$ となるように添加して調製した。試料溶液にこの6-OHDAを添加し490nmの吸収をキャリー分光光度計にて測定した。GSHの測定はHissinとHilfの方法⁸⁷⁾に従い、o-フタルアルデヒドを試料に添加し蛍光を励起波長350nm、蛍光波長420nmにて測定することによった。

(実験結果)

培養ヒト線維芽細胞に高圧酸素を曝露すると図4に示すように高圧酸素により圧力に応じて細胞増殖の低下が見られた。図5に示すように曝露時間 (a)、圧力 (b) に応じてコロニー形成数の減少が見られた。高圧窒素を同様に曝露させてもコロニー形成数の減少は見られなかった。また高圧酸素を曝露した培養液を細胞に添加してもコロニー形成数の減少は見られなかったこ

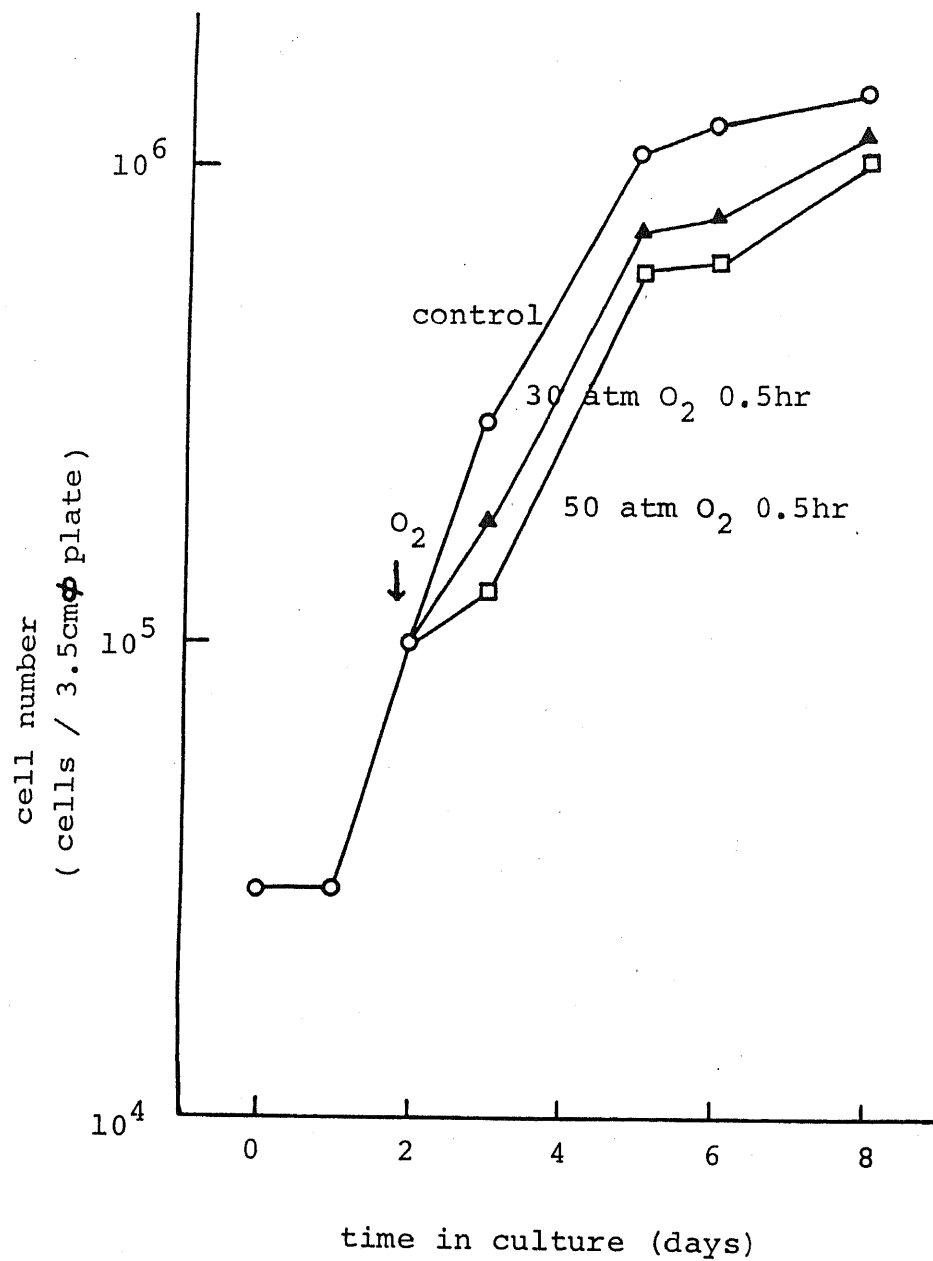


図4 高圧酸素のヒト正常線維芽細胞の増殖に及ぼす影響

(ヒト正常線維芽細胞 (WI-38) を播種した2日後、高圧酸素を曝露しその後の細胞数を調べた。)

とから、高圧酸素によるコロニー形成数の減少は細胞に対する酸素毒性の現れであると考えられる。50気圧酸素1時間曝露によってDNA合成は著しく阻害された(図6a)が、タンパク質合成には影響が見られなかった(図6b)。低濃度血清(0.5%)の培養液で培養した細胞に通常の濃度の血清(10%)を含む培養液を添加するとDNA合成が誘起されるが、このDNA合成は10%血清含有培地を添加してから2時間後、50気圧酸素を1時間曝露することにより著しく阻害された(図7)。次に、高圧酸素の細胞周期の進行に及ぼす影響を調べた(図8)。細胞周期はG₁(DNA合成の準備期、DNA:2C)→S期(DNA合成期、DNA:2C-4C)→G₂期(細胞分裂準備期、DNA:4C)→M期(細胞分裂期、DNA:4C)と進行する。0.5mMハイドロキシウレアを含む培養液で12時間培養してG₁期の末期に同調させ、通常の培養液に取り替えて細胞周期を開始させた。開始後2時間より4時間、6時間と2C量のDNAからの増大が観察されS期への移行とS期の進行が示された。開始後8時間には2C-4C間のDNAを持つ細胞がほとんどなくなり4C量DNAのピークが残り、G₂期とM期に移行していることを示す。開始後11時間では4C量のDNAのピークが消えM期からG₁期に移行したことを示す。G₁期の末期に30気圧酸素0.5時間曝露するとS期への移行とS期の進行が通常よりも遅れた。S期に曝露するとS期の進行が停止し、少なくとも6時間は細胞周期は進行しない。G₂またはM期に曝露してもG₂→M→G₁の進行は阻害されなかった。高圧酸素はDNA合成に及ぼす影響が顕著であった。次に細胞容積への影響を調べた。50気圧酸素を1時間曝露すると12時間後細胞容積の増大が見られた(図9)。

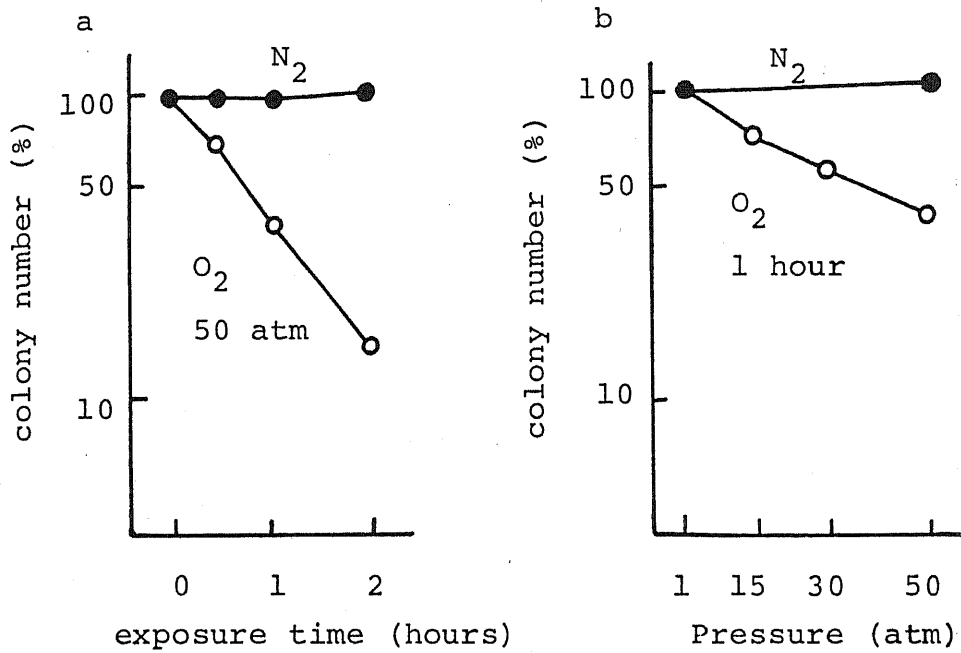


図5 高圧酸素のヒト正常線維芽細胞のコロニー形成に及ぼす影響

(ヒト正常線維芽細胞 (WI-38) に高圧酸素を曝露しその後のコロニー形成数を調べた。 a: 50気圧酸素および窒素を種々の期間曝露した。 b: 種々の圧力の酸素を1時間曝露した。)

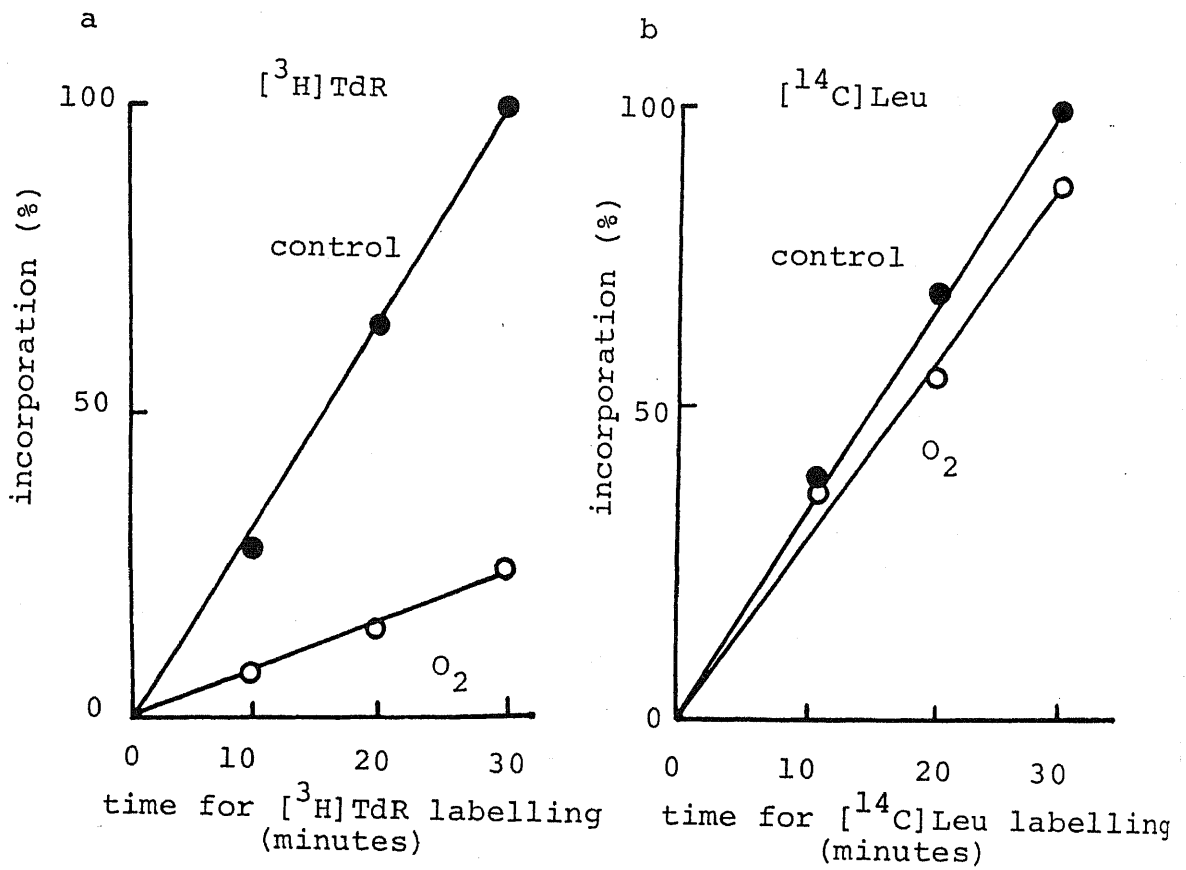


図 6 高圧酸素のヒト正常線維芽細胞のDNAおよびタンパク質合成に及ぼす影響

(ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に50気圧酸素を曝露した直後の [³H] TdR (a) および [¹⁴C] Leu (b) の冷TCA不溶画分への取り込みを測定した。)

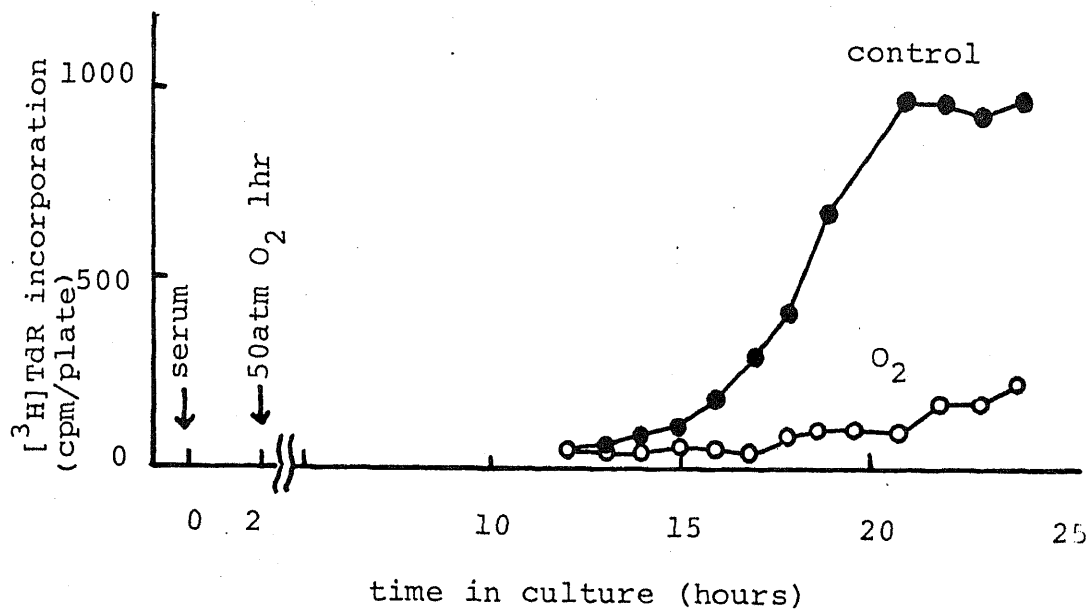


図7 高圧酸素のDNA合成に及ぼす影響

ヒト正常線維芽細胞を2日間、0.5%血清を含む培養液で培養した後10%血清を含む培養液と交換する。培養液交換後2時間に50気圧酸素を1時間曝露する。その後経時的に $[^3\text{H}]\text{TdR}$ の冷TCA不溶画分への取り込みを測定する。

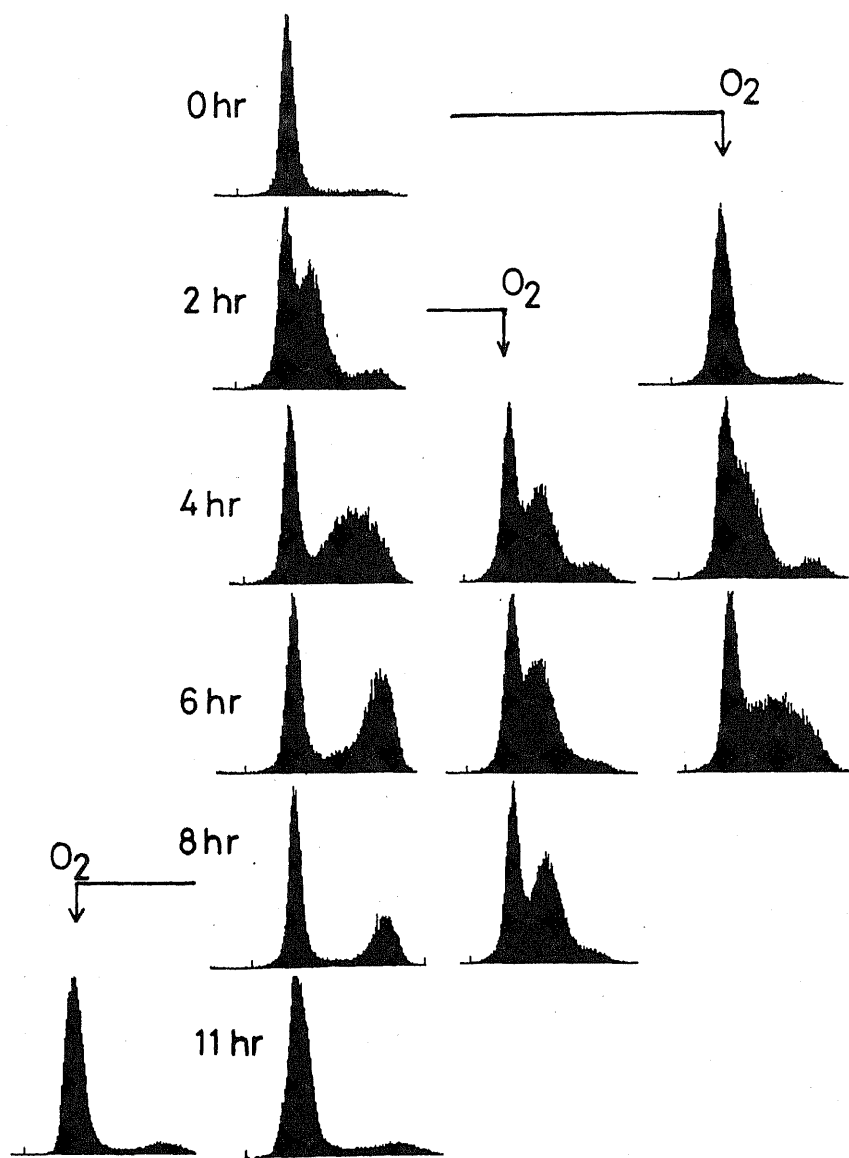


図8 高圧酸素のヒト正常線維芽細胞の細胞周期の進行に及ぼす影響

（ハイドロキシウレアでG₁期の終わりに止まっている細胞に通常の培養液を加えS期に移行させ細胞周期を進行させた。いくつかの時点で30気圧酸素を0.5時間曝露し細胞周期進行への影響を見た。

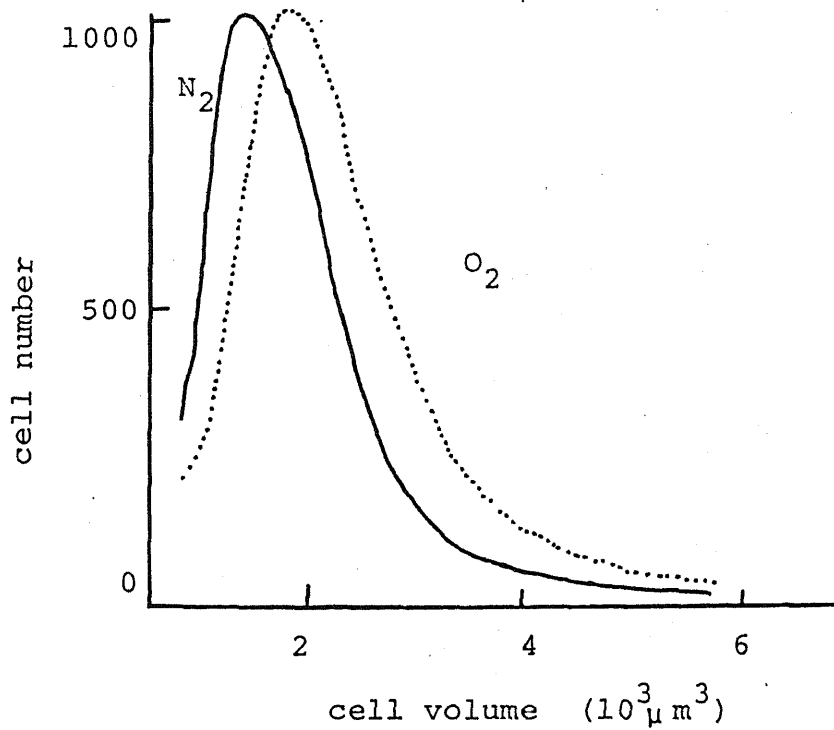


図9 高圧酸素のヒト正常線維芽細胞の容積に及ぼす影響

(ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に50気圧酸素または窒素を1時間
曝露し12時間後の細胞容積を測定した。)

1mM DDCを含む培養液で1時間、細胞を培養するとSOD活性が31%に低下した（対照：3.1u/mg protein, DDC：0.96u/mg protein）。このSOD活性が低下した細胞に高圧酸素を曝露すると無処理の細胞に曝露するよりもコロニー形成が著しく阻害された（図10）。

高圧酸素を曝露した後に細胞内GSH濃度が低下し、その後すぐに通常のレベルまで回復した（図11）。

（小括）

高濃度の酸素により生体が種々の障害を受けることが知られている。生体内では肺の炎症⁷⁷⁾や網膜の繊維化⁷⁶⁾、痙攣などの神経障害⁷⁵⁾、白内障の発症などが見られる⁷⁹⁾。これらの高酸素の曝露で、どのような活性酸素がどれだけ生成され、それらが生体のどの構成成分と反応することが細胞の機能低下に結びつくかを筋道立って理解することは未だなされていない。しかしSOD活性を増大させた時や^{80, 81)}SOD活性の欠損した突然変異体での⁸²⁾酸素毒性の観察や高酸素曝露時のグルタチオンの代謝の研究⁸³⁾等により酸素毒性の発現に活性酸素が関与していることが示唆されてきている。著者の実験結果は高圧酸素を曝露しコロニー形成の低下を測定することにより培養ヒト正常線維芽細胞の酸素毒性の受け易さを評価することを可能にしたものである。その毒性発現の機構は他の酸素毒性の系と同様に活性酸素が関与していることが示唆された。

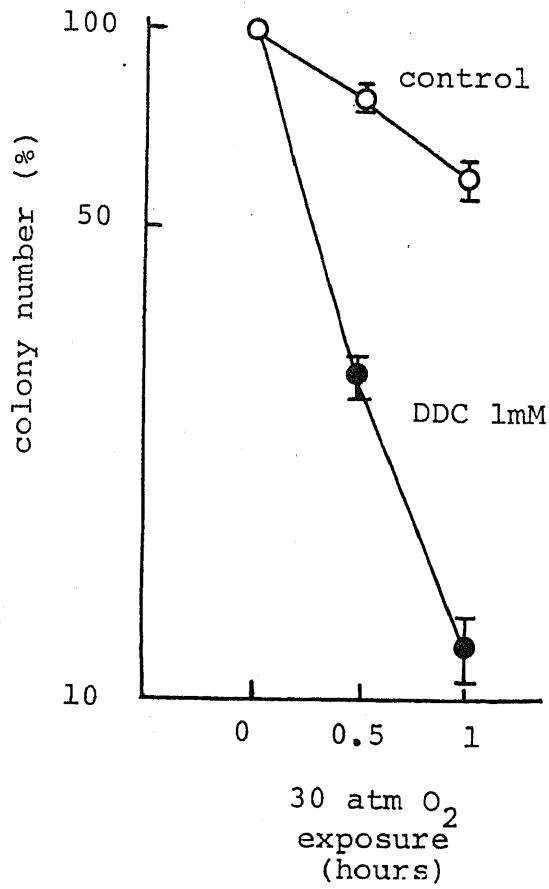


図 10 DDC前処理による高圧酸素毒性の促進

(SODの阻害剤DDC 1mMを1時間、ヒト正常線維芽細胞に処理し、その後、DDCを含まない培養液に交換し30気圧酸素を曝露しコロニー形成数を測定した。

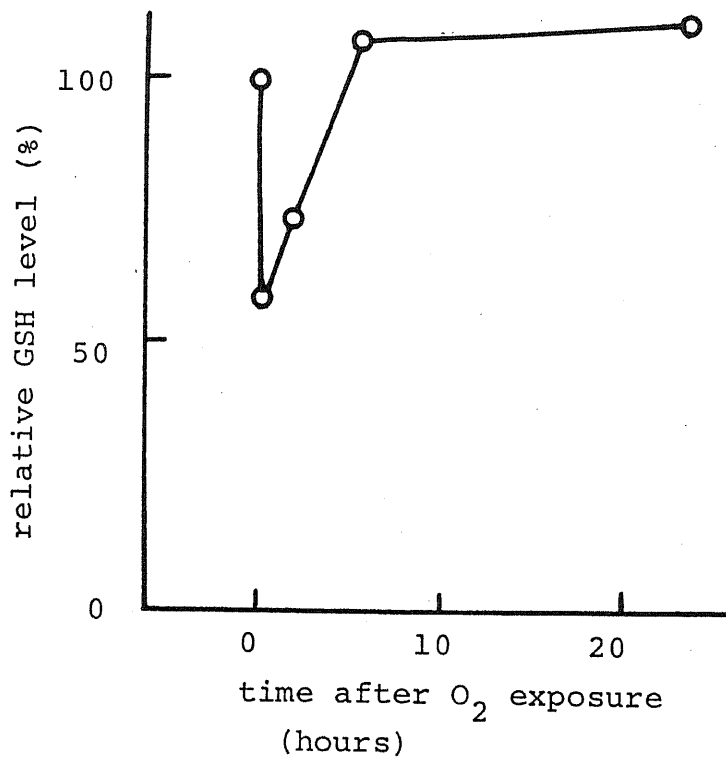


図 1 1 高圧酸素によるヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度に及ぼす影響

(ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に50気圧酸素を曝露し、直後から経時的に細胞内GSH濃度を測定した。)

第3節 試験管内加齢に伴う高圧酸素感受性の変化

(実験結果)

種々のPDのヒト正常線維芽細胞に対して50気圧酸素を曝露し、その後のコロニー形成を調べ、高圧酸素に対する感受性の試験管内加齢に伴う変化を調べた。どのPDの細胞でもコロニー形成が低下したが、PDの低い継代前期の細胞よりもPDの高い継代後期の細胞の方が高圧酸素によりコロニー形成が大きく低下した(図12)。次に高圧酸素の細胞増殖に及ぼす影響を継代前期細胞と継代後期細胞とで比較したところ、継代後期細胞の方が著しく細胞増殖が阻害された(図13)。この結果は試験管内加齢に伴って、細胞の高圧酸素感受性が高くなることを示す。図14は試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下(a)と50気圧酸素曝露(1時間)時のコロニー形成(b)の関係を示したものである。試験管内加齢に伴って細胞増殖が低下するよりも前に高圧酸素感受性が増大することを示す。活性酸素に対する防御機構の細胞構成成分と考えられているもののうちでSODの活性およびGSH量を継代前期細胞と継代後期細胞とで比較した。両者とも継代前期細胞と継代後期細胞で差が認められなかった(SOD活性、PD22: 3.1u/mg protein、PD56: 3.4u/mg protein、GSH濃度、PD28: 3.3nmol/ μ g protein、PD52: 3.3nmol/ μ g protein)。

第4節 考察

高圧酸素の曝露により培養ヒト正常線維芽細胞の増殖、コロ

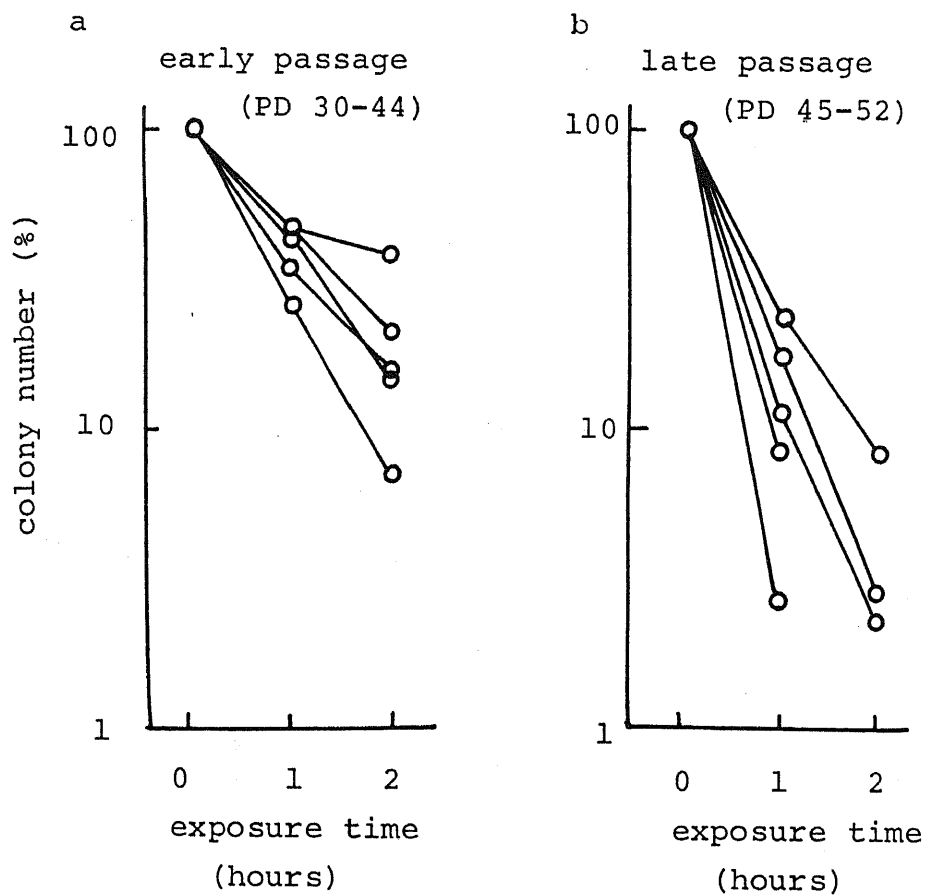


図 1 2 継代前期と継代後期のヒト正常線維芽細胞の高圧酸素感受性の比較

(種々のPDのヒト正常線維芽細胞 (WI-38) に50気圧酸素を曝露し) コロニー形成数を調べた。

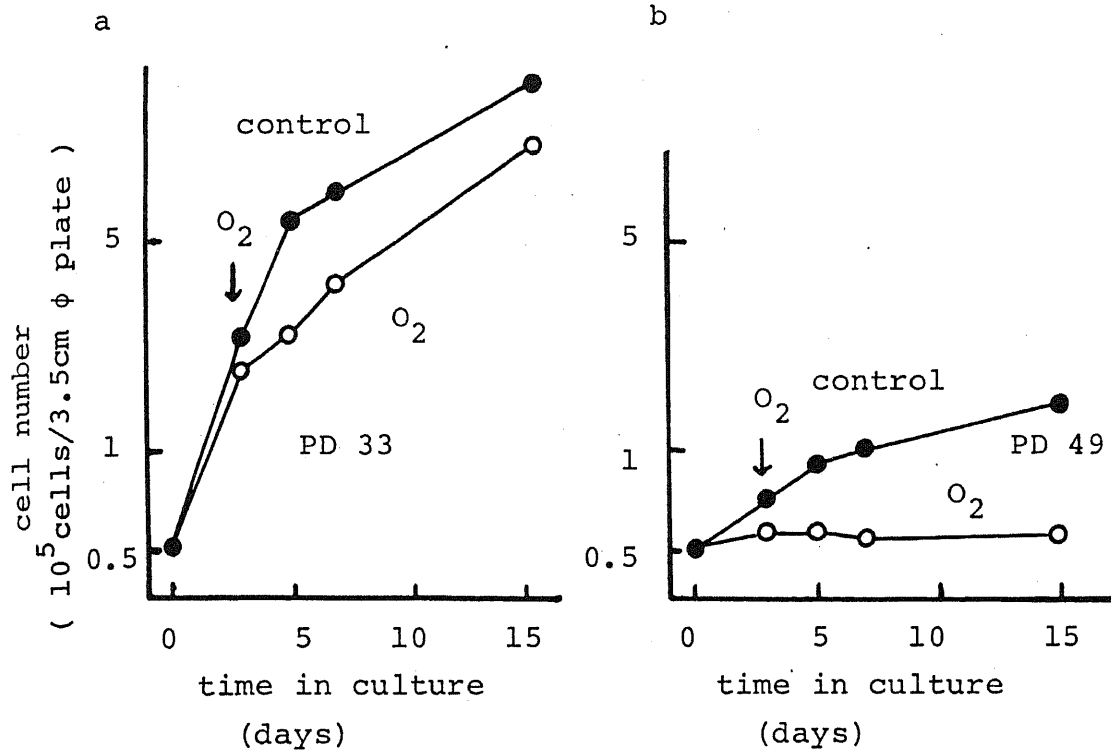


図 1 3 高圧酸素による細胞増殖に及ぼす影響の継代前期と継代後期での比較

(ヒト正常線維芽細胞 (WI-38) に75気圧酸素1.5時間を2回曝露した時の細胞数の変化をPD33とPD49で比較した。)

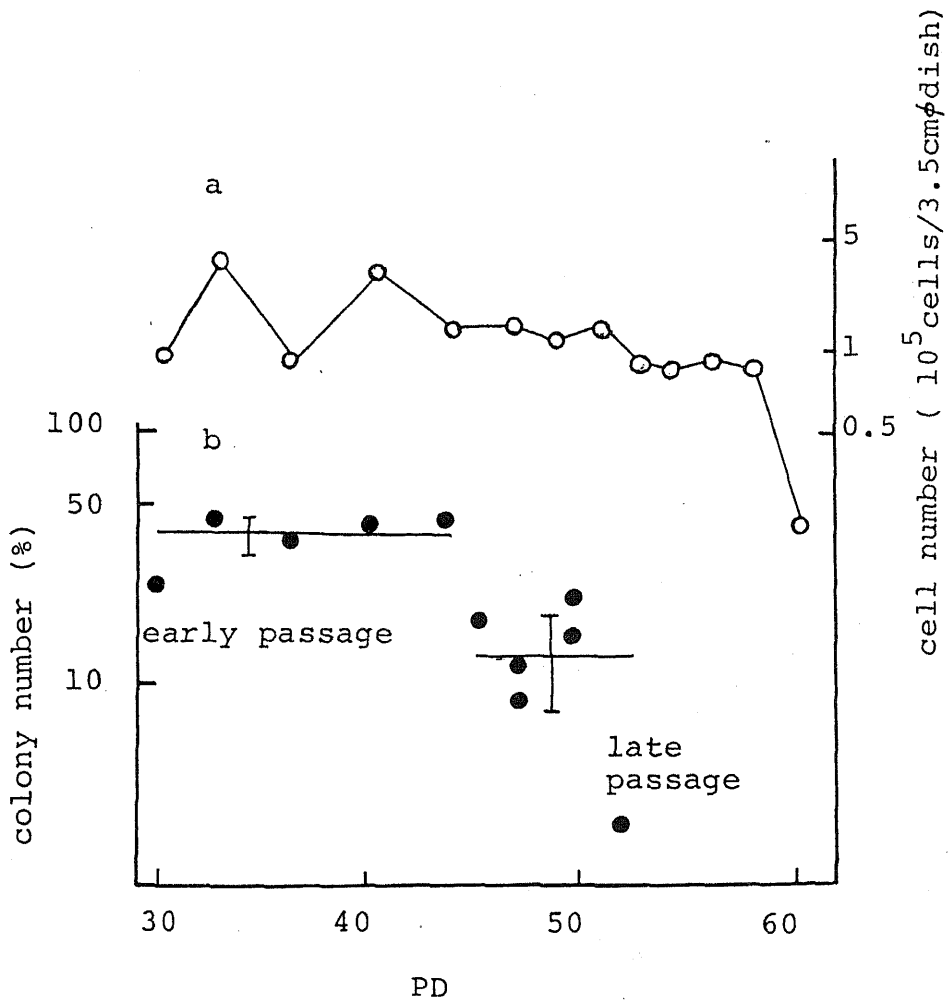
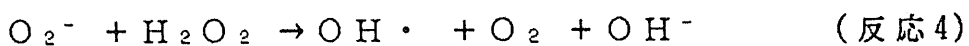


図 1 4 ヒト正常線維芽細胞の試験管内加齢に伴う細胞増殖と高圧酸素感受性の変化

(継代後1週間後の細胞数 (a) と50気圧酸素1時間曝露後のコロニー形成の割合 (b) をPDに対し図示した。)

ニ一形成、DNA合成が阻害され、細胞容積が増大した。この作用は、高圧窒素では見られないことや高圧酸素を曝露した培養液を細胞に加えても効果がないことから酸素の毒性によるものと考えられる。酸素毒性の機構は培養細胞⁸⁹⁾など種々の生体系で研究されてきた⁷⁵⁾。Fridovichによれば⁹⁰⁾通常 conditions で酸素毒性が現れないのはスーパーオキシドラジカルなどの活性酸素の生体内での生成と防御機構による分解が平衡しているからであり、そして高濃度の酸素に生体が曝露されるとスーパーオキシドラジカルの生成が増大しこの平衡が崩れる。SODやグルタチオン系などの防御機構から逃れた活性酸素はタンパク質や脂質、DNAなどを非特異的に酸化しその機能を低下させ生体に傷害を与えるというものである。この酸素毒性のスーパーオキシドラジカル仮説は現在論争中である^{91, 92)}。スーパーオキシドラジカル自身の反応性は高くなく、直接、生体構成分子と反応することは考えにくい。鉄などの金属の存在下でのHarbor-Weiss反応(反応4)などにより



ヒドロキシルラジカルや、一重項酸素などのより強い酸化力を持った活性酸素に変換されて反応するとする仮説も提唱されている⁹³⁾。細胞のSODを増大させた大腸菌⁸¹⁾や動物⁸²⁾では高圧酸素の毒性に対して感受性が低いことは酸素毒性の発現にスーパーオキシドラジカルが中心的な役割を演じていることを示唆する。DDCを培養ヒト正常線維芽細胞をDDCで処理してSOD活性を低下させ高圧酸素を曝露したところその障害が促進されることを観察した(図10)。培養ヒト正常線維芽細胞への高圧酸素

障害の発現にスーパーオキシドラジカルが関与していることが示唆された。SODがスーパーオキシドラジカルを特異的に代謝するのに対し細胞のグルタチオン系は種々の活性酸素を代謝し、酸化された生体成分を還元し、SODと共に活性酸素に対する防御機構を構成していると考えられている⁹⁴⁾。高濃度の酸素を曝露した時のグルタチオンの代謝の研究⁸⁸⁾から高濃度の酸素により活性酸素が生成しグルタチオン系が防御系として働いていることが示唆されてきた。培養ヒト正常線維芽細胞に高圧酸素を曝露したところ細胞内GSH濃度の低下を観察した(図11)。第4章においてさらに高圧酸素曝露による培養ヒト正常線維芽細胞の障害の防御にGSHが関与していることを示す。高圧酸素曝露により、どのような活性酸素がどの細胞構成成分をどのように酸化したことが培養ヒト正常線維芽細胞の障害に関与したかは現在未だ明らかにできていない。しかし活性酸素が関与していることのいくつかの傍証が得られた。

高圧酸素曝露によるコロニー形成の阻害の程度から細胞の酸素毒性の受け易さを知ることが出来ると考えられる。培養ヒト正常線維芽細胞の継代後期細胞の方が継代前期細胞よりも高圧酸素曝露によるコロニー形成と増殖の阻害が著しく、酸素毒性を受け易いことは興味深い。特に試験管内加齢に伴った細胞増殖の低下より少し以前から酸素毒性に対して感受性が高くなること(図14)は老化の原因を考える上で示唆的である。種々のストレスに対する細胞の感受性の継代前期と後期での違いを調べた研究がある。電離放射線⁹⁵⁾と紫外線⁹⁶⁾の感受性は継代前期細胞と継代後期細胞で同様であった。可視光⁹⁷⁾とアスコルビン

酸⁹⁸⁾に対する感受性はむしろ継代前期細胞の方が高い。継代後期細胞の方が感受性が高いことが今までに明らかになったストレスは高圧酸素が唯一のものである。継代後期細胞において高圧酸素感受性が高まる原因は何であろうか？高圧酸素感受性を決めるいくつかの要因が考えられる。第一に活性酸素に対する防御能であり、第二に活性酸素の生成量であり、第三に障害の修復能である。活性酸素に対する防御機構の培養ヒト肺由来正常線維芽細胞の試験管内加齢に伴う変化に関してはいくつかの報告がある。SOD⁹⁹⁾、カタラーゼ¹⁰⁰⁾、グルタチオンペルオキシダーゼ¹⁰¹⁾およびGSHの濃度¹⁰²⁾は継代前期と後期で差が認められていない。著者もSOD活性およびGSH濃度を測定したが継代前期と後期でやはり差が認められなかった。培養ヒト正常線維芽細胞の活性酸素の生成量は現在までに測定されていない。第3章に高圧酸素障害の修復が継代後期細胞で低下していることを示す結果を提出する。

第2章 高圧酸素曝露による試験管内細胞老化の促進

老化のフリーラジカル説をヒト正常線維芽細胞の試験管内老化の系で証明するために設定した第一の課題は細胞内に活性酸素の生成を増大させたときに老化が促進することを確認することである。細胞内に活性酸素の生成を増大させるにはX線や光照射、パラコートやメナジオン、ジアミドなどの培養液への添加、高圧酸素曝露など種々の方法がある。薬(毒)物を用いた場合、活性酸素ではなく化合物自体の毒性の問題があり、X線照射の場合X線による直接のDNA切断の問題がある。高圧酸素は、通常の酸素濃度で生成される種々の活性酸素がそれぞれ増幅して生成することが期待されることから高圧酸素曝露の方法を採った。培養ヒト正常線維芽細胞に高圧酸素を曝露し試験管内老化の指標である細胞増殖と細胞容積の変化を調べ、細胞の寿命を測定した。

第1節 高圧酸素曝露による試験管内老化の促進

(実験方法)

培養ヒト肺由来正常線維芽細胞(WI-38細胞、TIG-1細胞)を用いた。培養方法、高圧酸素および窒素曝露は第1章の実験方法と同様である。

細胞容積はトリプシンで剥し単細胞にした細胞をコールターカウンター(ZBI型)とそれに接続された粒度分布計(C-1000型)を用いて測定した。

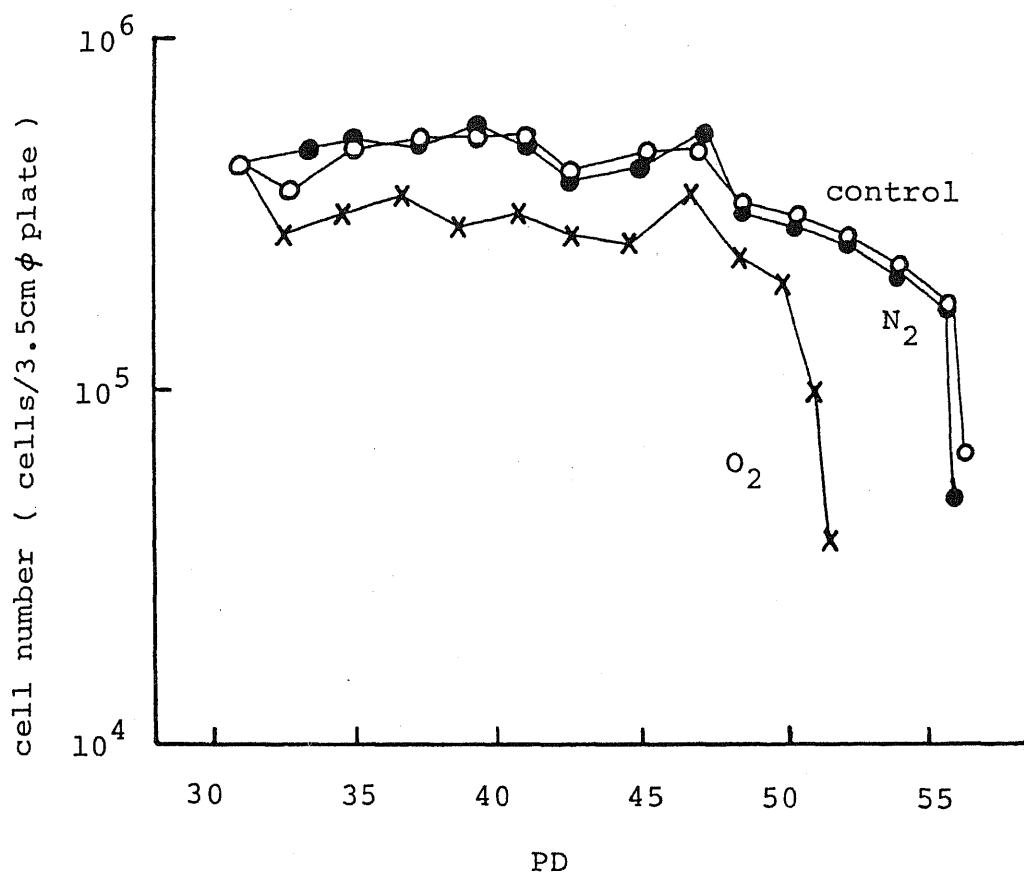


図 15 高圧酸素曝露によるヒト正常線維芽細胞の試験管内老化に及ぼす影響

(ヒト正常線維芽細胞 (WI-38) に PD31 より毎週 50 気圧酸素または窒素を 1 時間づつ曝露し続け、継代後 1 週間目の細胞数を測定した。)

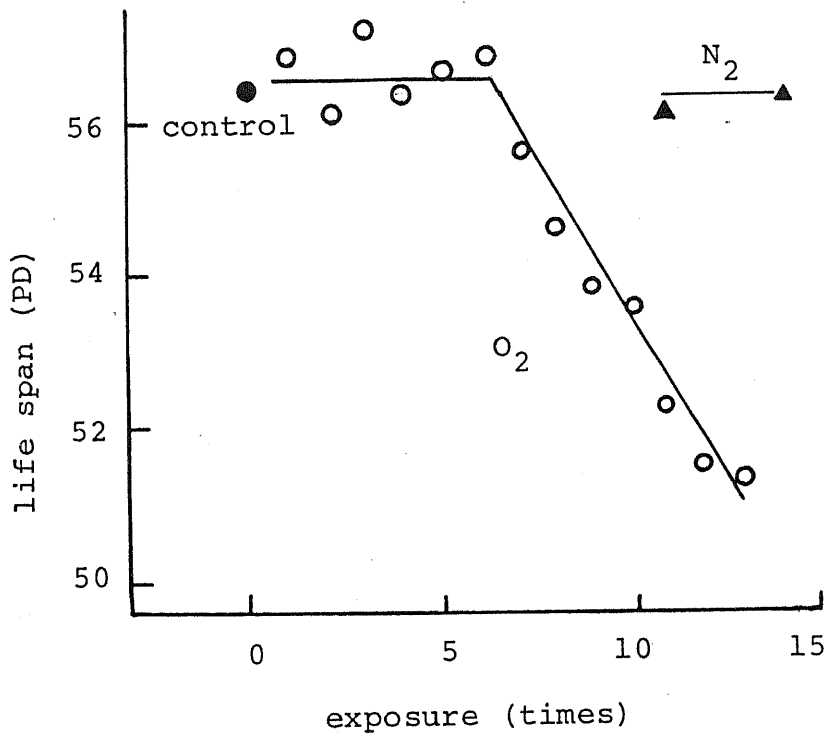


図 1 6 高圧酸素曝露回数の一ト正常線維芽細胞の試験管内寿命への影響

(PD31より50気圧酸素または窒素を1時間づつ毎週曝露し、横軸に示した回数曝露した後、曝露せずに継代した時の試験管内寿命を図示した。)

(実験結果)

培養ヒト正常線維芽細胞(WI-38)をPD31より1週に1度、50気圧酸素または窒素を1時間ずつ曝露し継代を続けた。図15に示すように一定期間活発な細胞増殖を経た後、細胞増殖が低下し、ついには細胞増殖が停止したが、高圧窒素曝露と無処理の対照の細胞ではPD56で増殖が停止したのに対し、高圧酸素曝露の細胞ではより早く増殖が低下し始めPD51で増殖が停止した。次にPD31より1週に1度、50気圧酸素1時間づつの曝露を1から14回行い、それぞれの回数の曝露を終了後、継代を続け増殖が停止するPD(寿命)を測定し、曝露回数と寿命の関係を調べた。図16に示すように7回曝露までは寿命への影響はみられなかったが、8回以上では曝露回数に応じて寿命が減少した。窒素曝露11回および14回では寿命への影響は見られなかった。寿命短縮のために8回以上の高圧酸素曝露が必要であることの一つの説明は酸素曝露8回分の障害が蓄積されて初めて寿命への影響が現れるというものである。他の説明はPD31より酸素曝露を始めて8回目のPDにおいては細胞が高圧酸素に対し感受性が高くなっているというものである。

第2節 継代後期細胞の高圧酸素曝露による老化の促進

第1章の実験で継代の進んだ細胞は酸素に感受性が高いことが明らかになっていることから曝露8回目を受けるPDより以降に酸素に対する感受性が高くなるために8回以上で寿命の減少が見られたのではないかと考えた。そこで継代前期の細胞と継代後期の

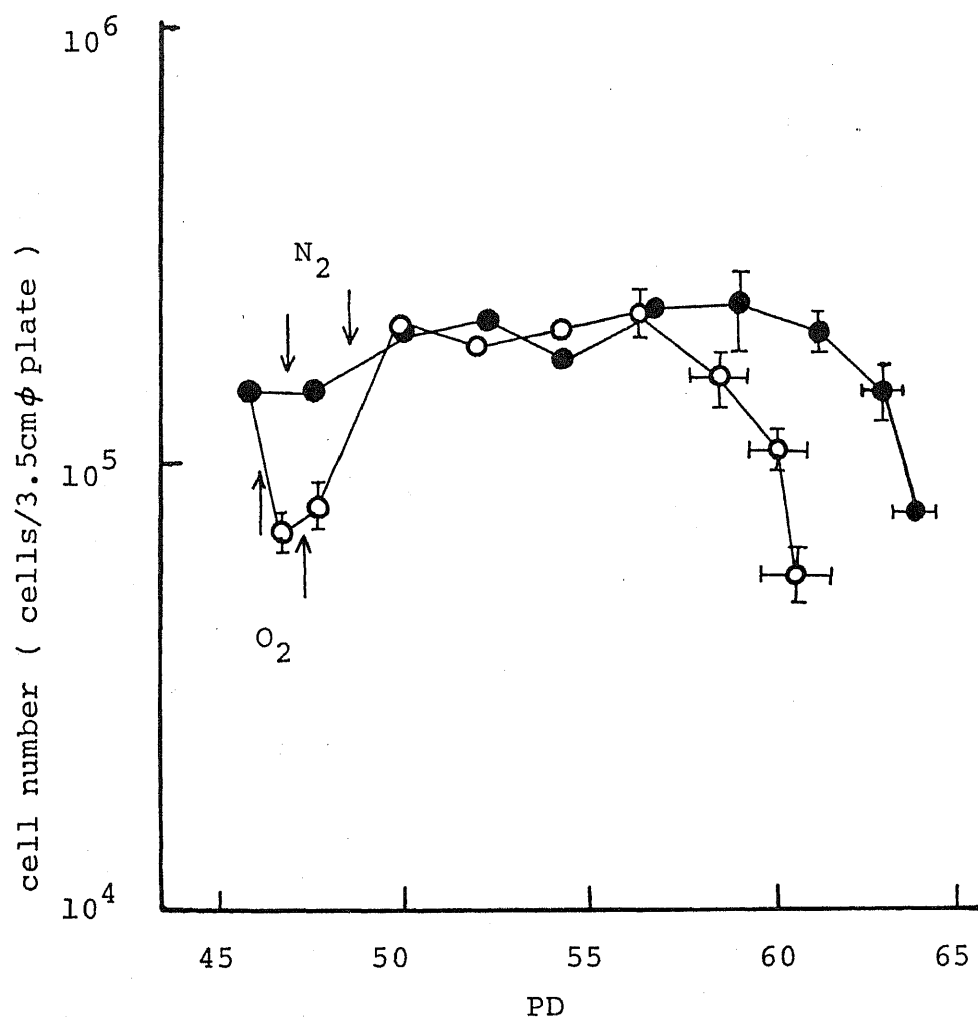


図 17 継代後期のヒト正常線維芽細胞の試験管内老化に及ぼす高圧酸素の影響

ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に継代後期 (PD47) より 50 気圧酸素または窒素を 1 時間づつ 2 回曝露し、その後の継代 1 週間目の細胞数を測定した。

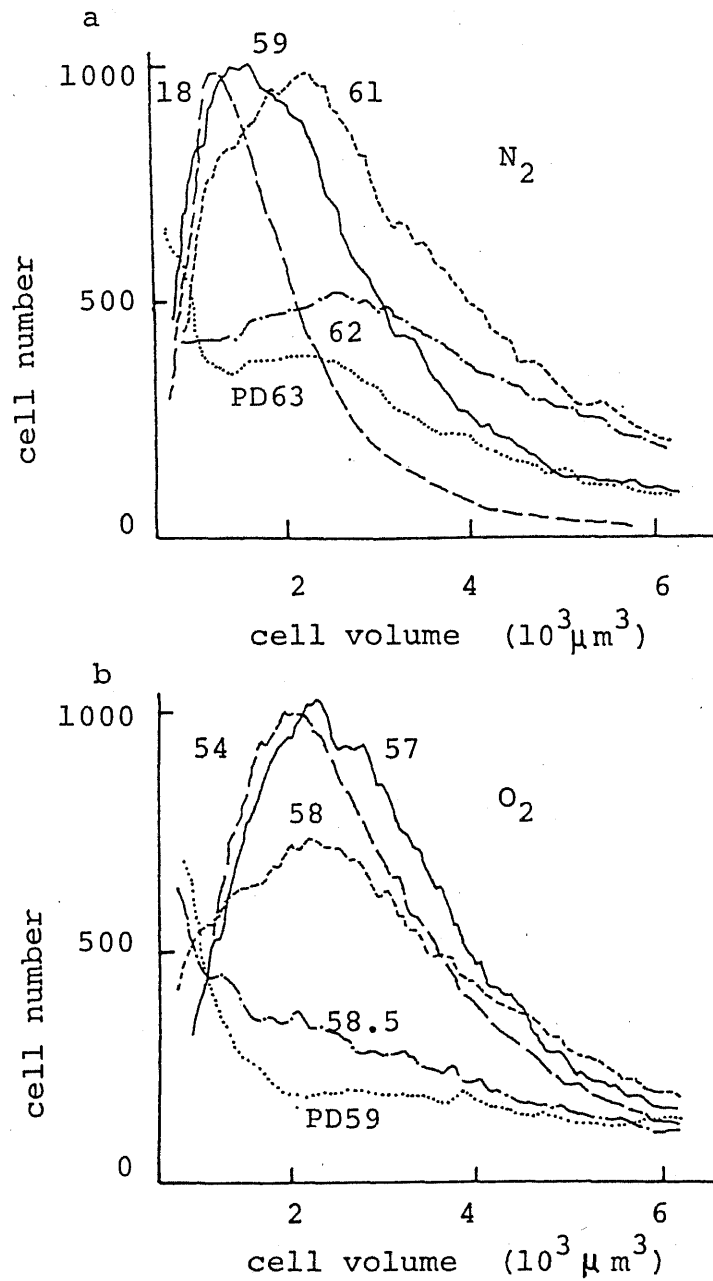


図 18 高圧酸素のヒト正常線維芽細胞の容積に及ぼす影響

(ヒト正常線維芽細胞の容積分布を図 17 の各時期で測定した。)

細胞に高圧酸素を曝露し試験管内加齢に伴う細胞増殖と細胞容積の変化と寿命を調べた。

(実験結果)

PDの少ない継代前期の細胞 (TIG-1細胞) とPDの多い継代後期の細胞に1週に1度、50気圧酸素1時間づつの曝露を2回行い寿命を測定した。継代前期の細胞 (PD35および37) に曝露した場合には酸素による寿命の短縮が見られなかった (窒素: $PD66.0 \pm 2.3$ 、酸素: $PD65.3 \pm 1.9$) が、継代後期の細胞 (PD47および48) に曝露すると酸素による寿命の短縮が認められた (図17)。図17に示すように継代後期の細胞に2回50気圧酸素を1時間づつ曝露すると加齢に伴う増殖低下、増殖停止が早く起きる。試験管内加齢に伴って細胞容積が増大し不均一になって行くことが知られ、加齢の一つの指標とされている⁴⁰⁾。そこで継代後期に50気圧酸素を1時間づつ2回曝露した後の細胞容積変化を調べた。対照ではPD59より細胞容積が増大し始めたが (図18a)、酸素曝露ではPD54より容積の増大が認められた (図18b)。対照ではPD63で、酸素曝露ではPD59で細胞容積の最頻値を示すピークが見られなくなり細胞容積の不均一化が進んだ (図18aおよびb)。これらの結果は継代後期の細胞に高圧酸素を曝露すると試験管内加齢の過程が加速されることを示す。

第3節 考察

培養ヒト正常線維芽細胞に毎週1度1時間づつ高圧酸素曝露を

続けると試験管内老化の促進が見られた。継代前期より酸素曝露を始め1から14回曝露し、それぞれの細胞の寿命を測定したところ7回曝露までは寿命の短縮は見られなかったが8回以上は回数に応じて寿命が短縮された。この現象の理由として、第1章で示されたように継代後期の細胞が高圧酸素に感受性が高いことから継代後期の細胞では酸素曝露により寿命短縮が起こるといふ可能性を考えた。実際に継代後期の細胞に2回高圧酸素を曝露したところ寿命の短縮が見られた。継代後期の細胞に高圧酸素を曝露し試験管内老化の指標（細胞増殖の低下と細胞容積の増大）を調べたところ酸素曝露では老化の指標が早く現れ、高圧酸素により試験管内老化が促進されたことが示された。

種々のストレスを培養ヒト正常線維芽細胞に与え試験管内老化に及ぼす影響を調べた報告がある。光照射では寿命の延長が見られる¹⁰³⁾。紫外線照射(5および10J/m²)を14回繰り返しても寿命の短縮は認められない⁴⁹⁾。突然変異を引き起こす量のEMSやMNNGを14回処理しても寿命は短縮されない⁵⁰⁾。間違ったアミノ酸をタンパク質中に取り込ませるエチオニンやp-フルオロフェニルアラニン⁴⁷⁾を培養液中に加えても寿命は短縮されない。一方、電離放射線を照射すると寿命の短縮が見られる¹⁰⁴⁾。特に低線量の電離放射線では継代前期の細胞では影響が見られないが継代後期の細胞では寿命を短縮させ¹⁰⁵⁾、この点に関しては高圧酸素の場合と類似している。電離放射線と酸素の毒性は種々の共通点が見られ、それらの毒性発現に共通の機構があることが提案されている¹⁰⁶⁾。水の電離放射線照射により実際にスーパーオキシドラジカルやヒドロキシルラジカルが生成す

る¹⁰⁷⁾。Harmanは電離放射線照射が個体の寿命を短縮させること¹⁰⁸⁾に酸素ラジカルが関与すると考え通常生成する酸素ラジカルが老化の原因であるとする老化のフリーラジカル説を提出している⁵¹⁾。しかし、第1章で述べたように高圧酸素に対する感受性の試験管内加齢に伴う変化は電離放射線の感受性の試験管内加齢に伴う変化と異なり、また第3章で述べるように高圧酸素による障害の修復機構は電離放射線による障害の修復機構と異なることは電離放射線と高圧酸素による障害の機構が異なることを示唆する。

試験管内細胞加齢の老衰期では染色体異常¹⁰⁹⁾や自家蛍光物質の細胞内への蓄積⁴¹⁾、細胞容積の増大⁴⁰⁾など種々の老化現象を示す。高圧酸素を継代後期に曝露すると老衰期が早く訪れることが明らかになった。高濃度の酸素で染色体異常が起こること¹¹⁰⁾、高圧酸素により細胞容積の増大や細胞増殖の低下、DNA合成の障害が起こること、そして自家蛍光物質が脂質の過酸化により生成されと考えられており¹¹¹⁾、老衰期の細胞の諸変化は活性酸素により引き起こされ得る。第1章で明らかになったように継代後期の細胞では高圧酸素に対して感受性が高い。このことは継代後期では通常生成される活性酸素でも細胞に障害が継代前期よりも強く与えられ老衰期の種々の老化現象を引き起こすことが考えられる。

第3章 高圧酸素障害の修復能の細胞加齢に伴う変化

活性酸素が試験管内老化の原因の一つなら活性酸素による障害が細胞により修復されず蓄積されるものでなければ老化の不可逆的な過程を説明できない。特に継代後期から老衰期が生じる過程に活性酸素の関与を考えるならば継代後期において活性酸素による障害が修復されないことを示す必要がある。そこで培養ヒト正常線維芽細胞に高圧酸素を曝露し、それによって低下したコロニー形成能とDNA合成能の回復を時間を追って調べ、継代前期細胞と継代後期細胞とで比較し、修復能の変化を調べた。

第1節 高圧酸素によるコロニー形成能の障害の回復

(実験方法)

培養ヒト胎児肺由来線維芽細胞 (TIG-1細胞) を用いた。培養方法は第1章の実験方法と同様である。10%ウシ胎児血清を含むBME培養液で培養した細胞に75気圧の酸素または窒素を1.5時間曝露し、その後種々の期間、低濃度の血清 (0.5%) を含むBME培養液にて細胞増殖を停止させておく。その後トリプシンで剝し単細胞にした細胞を500ないし1000個6cm径培養皿に播種し10%血清含有培養液にて8日培養しメチレンブルーで染色し50細胞以上の細胞の塊を1コロニーと数える。

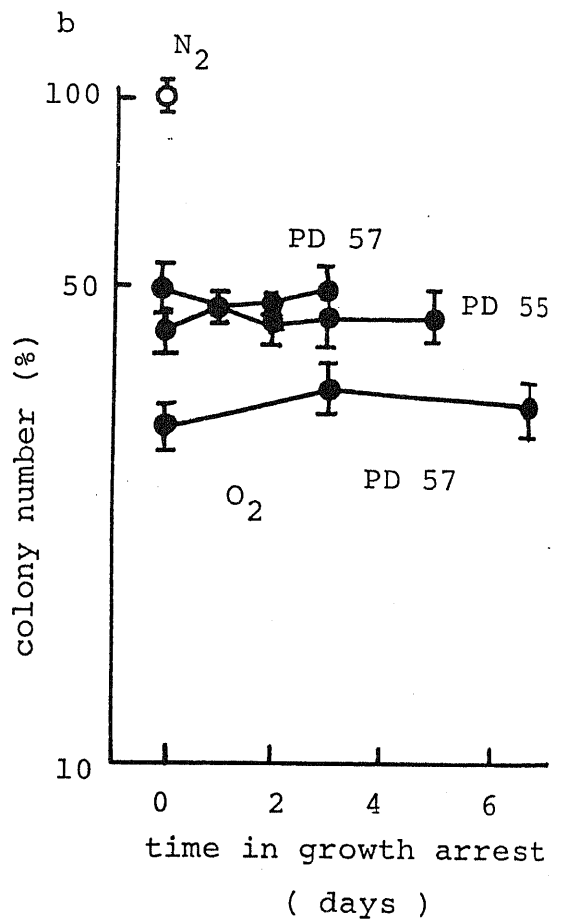
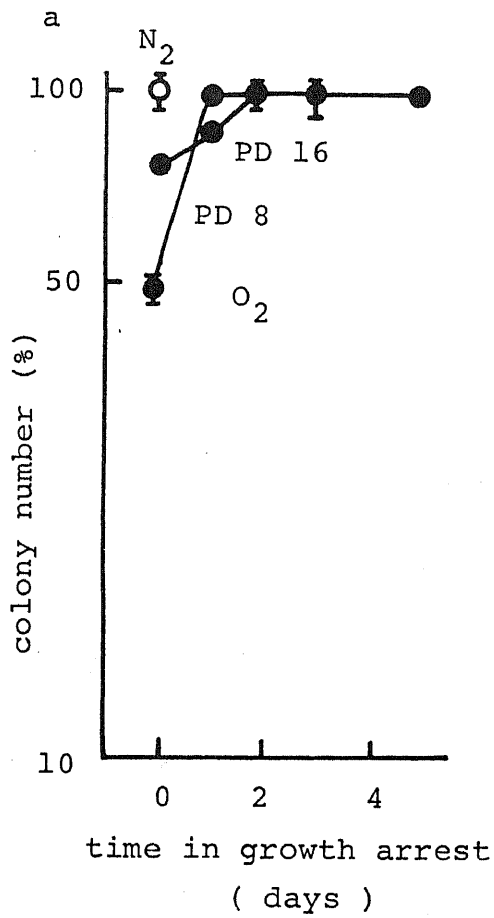


図 19 高圧酸素による継代前期と継代後期のヒト正常線維芽細胞のコロニー形成能の障害の回復の比較

ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に75気圧酸素を1.5時間曝露後、0.5%血清含有培養液で横軸の期間培養し、その後コロニー形成能を測定した。

(実験結果)

培養ヒト正常線維芽細胞に75気圧酸素を1.5時間曝露したところ第1章で見られたように継代前期の細胞も継代後期の細胞もコロニー形成数の低下が見られた。継代前期の高圧酸素処理細胞を種々の期間、増殖停止状態においたところ1日ないし2日で高圧酸素によるコロニー形成能の障害が回復し、無処理の細胞と同様のコロニー形成能に回復した(図19a)。一方、継代後期の高圧酸素処理細胞を増殖停止状態においたところ3日ないし7日経ってもコロニー形成能の回復は見られなかった(図19b)。この結果は継代前期の細胞では高圧酸素障害を修復することができるが継代後期の細胞は修復能が低下していることを示している。

第2節 高圧酸素によるDNA合成の障害の回復

(実験方法)

DNA合成を行っている細胞数の測定はオートラジオグラフィーによった。トリプシンでシャーレから剥して単細胞にした細胞を $[^3\text{H}]$ -メチルチミジン(比活性185GBq/mmol、最終濃度3.7KBq/ml)を含む培養液(10%血清含有)にて16、28および40hr培養しエタノール-氷酢酸(3:1, vol比)で細胞を固定した。5%TCAに4℃1時間浸かし、エタノールで洗った後、一夜乾燥させた。サクラNRM2写真乳剤で細胞を被い8日間暗所に放置した。乳剤を現像し固定した。細胞はギムザ液で染色した。各サンプルごとに300細胞を検査し標識された核を持つ細胞の割合を調べ

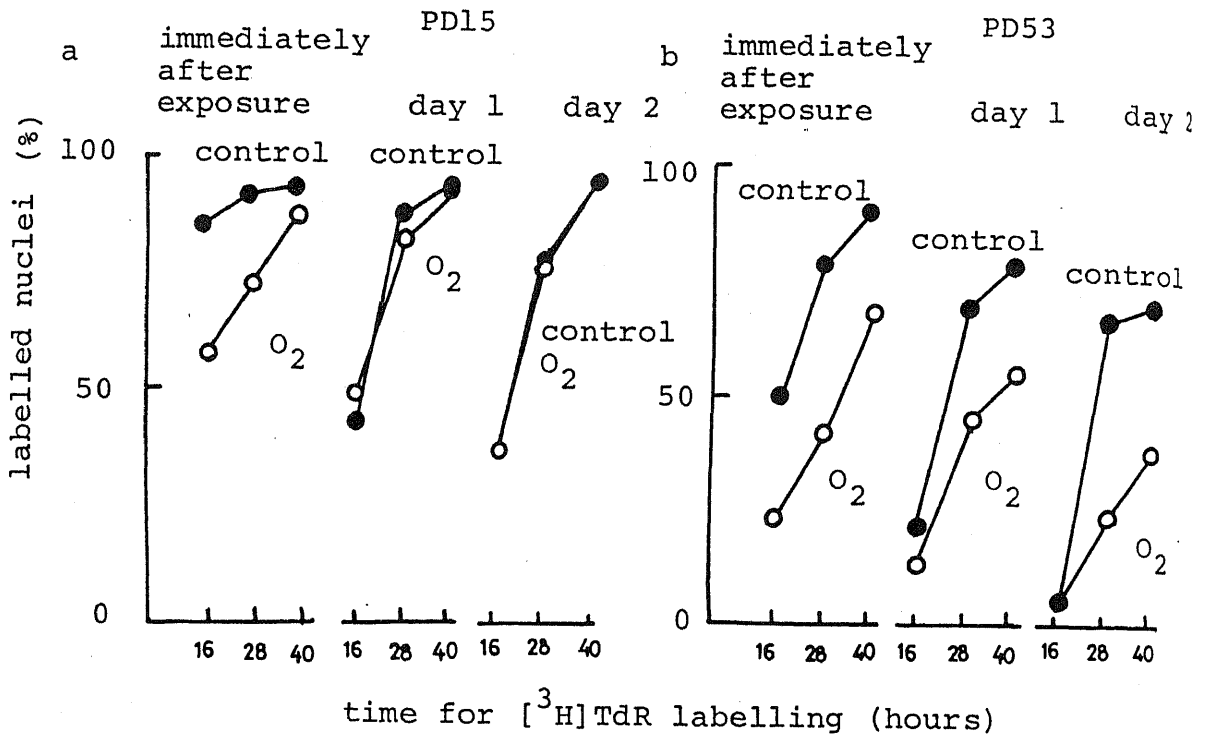


図 20 高圧酸素による継代前期と継代後期のヒト正常線維芽細胞のDNA合成の障害の回復の比較

PD15とPD53のヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に75気圧酸素を1.5時間曝露後、0.5%血清含有培養液で1および2日培養し、10%血清含有培養液中でDNA合成を測定した。

た。

(実験結果)

継代前期 (PD15) および継代後期 (PD53) の培養ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1細胞) に高圧酸素 (75気圧1.5時間) を曝露するとどちらもDNA合成の阻害が見られる (図20)。継代前期の細胞では高圧酸素曝露後、1日低濃度血清 (0.5%) 含有培養液で増殖停止状態に置くと、高圧酸素処理細胞も無処理の細胞と同様のDNA合成のレベルまで回復した。一方、継代後期の細胞では高圧酸素曝露後、2日間増殖停止状態に置いてもDNA合成の回復は見られなかった。この結果はやはり継代前期細胞では高圧酸素障害を修復できるが継代後期細胞は修復能が低下していることを示している。

第3節 高圧酸素障害の回復に及ぼす阻害剤の影響

継代前期の培養ヒト正常線維芽細胞では高圧酸素障害が回復されることが明らかになった。この機構を知る手掛かりを得るために回復に及ぼすDNA合成およびタンパク質合成阻害剤の影響を調べた。

(実験方法)

タンパク質合成は [^3H] -ロイシン (比活性2.2TBq/mmol、最終濃度111kBq/ml,) を含む培養液で2時間培養し冷TCA不溶画分への取り込みを調べることにより評価した。培養後5%TCAに4℃、

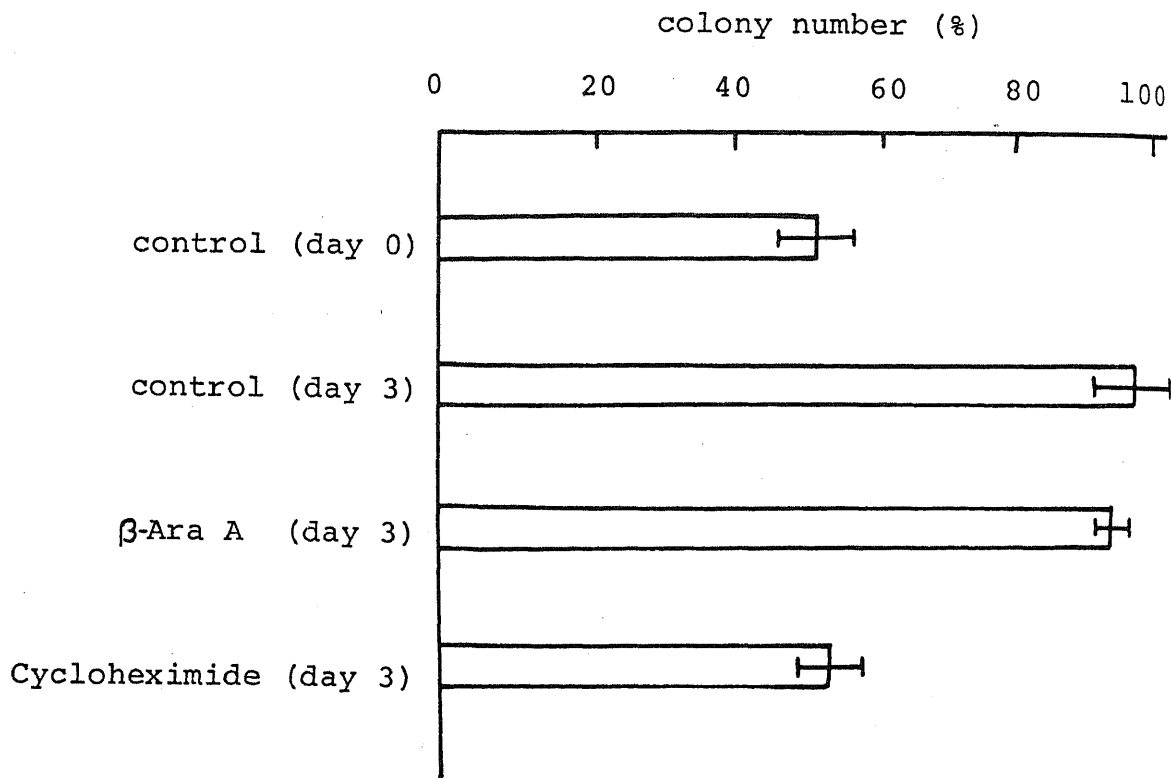


図 2 1 高圧酸素障害の回復に及ぼす阻害剤の影響

（ヒト正常線維芽細胞（TIG-1）に75気圧酸素を1.5時間曝露後、3日間 β -araAまたはシクロヘキシミドを含む0.5%血清の培養液で培養しコロニー形成数を測定した。）

1時間浸けた。0.1N NaOHで溶解し液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

(実験結果)

培養ヒト正常線維芽細胞（継代前期細胞）に高圧酸素（75気圧、1.5時間）を曝露した後、DNA合成阻害剤 β -アラビノグアノシルアデニン（ β -araA、 $10\mu\text{M}$ ：オートラジオグラフィでDNA合成細胞が見られない）を含む低濃度血清培養液にて3日間培養したところ、高圧酸素曝露後阻害剤を加えない対照と同様に回復した（図21）。一方、高圧酸素曝露後、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド（ $4\mu\text{M}$ ：タンパク質合成を78%阻害する）を含む培養液で3日間培養しても全く回復しなかった（図21）。この結果は高圧酸素障害を修復するために新たにタンパク質が合成される必要があるが、新たにDNAが合成される必要はないことを示す。

第4節 考察

電離放射線や紫外線などの毒作用を持つ種々の物理因子や化学物質による細胞障害に対する細胞の修復能が調べられている。よく使われる細胞の修復能を評価する方法は潜在的致死障害修復(Potentially Lethal Damage Repair, PLDR)と呼ばれるものである^{1,2)}。ある毒性因子を与えるとコロニー形成が低下するが、毒性因子を与えた後、低濃度血清含有培養液にて細胞増殖を停止させる条件に置き経時的にコロニー形成能を測定すると

コロニー形成能が上昇して行きついには毒性因子を与えない対照と同様のコロニー形成能を示すまでに回復する。回復に要する時間で細胞の持つその因子による障害の修復能を評価する。色素性乾皮症の患者の細胞は紫外線による障害に対する修復が欠損していること、また毛細血管拡張性運動失調症の患者の細胞は電離放射線による障害を修復できないことがPLDRを測定することから明らかにされている¹¹³⁾。

ヒト正常線維芽細胞の継代後期において活性酸素による障害に対する修復能が低下している可能性を確かめるため、継代前期細胞と継代後期細胞での高圧酸素障害の修復をPLDRの方法で測定することにより比較した。継代前期の細胞では75気圧酸素1.5時間曝露によるコロニー形成数の減少が1-2日で回復された。一方、継代後期の細胞では3-7日経ても回復されず、継代後期の細胞は高圧酸素による障害から回復できなかつた。DNA合成能で測定しても同様な結果が得られた。これらの結果は試験管内加齢に伴って活性酸素による障害の修復能が低下することを示唆する。第2章で継代後期の細胞に高圧酸素を曝露すると老衰期が早く現れ、寿命が短くなることが明らかになったが、これは継代後期に受けた高圧酸素の障害が修復することができず障害が蓄積されてしまうためと考えられる。通常の高圧酸素濃度下でも活性酸素の生成が知られている⁷⁴⁾がヒト正常線維芽細胞で継代後期に生成されたとき、それらによる障害を修復できず蓄積され老化における不可逆的過程を引き起こすことが考えられる。この蓄積が老衰期における細胞増殖の低下、細胞容積の増大、染色体異常あるいは自家蛍光物質の蓄積などを引き起こし、つい

には増殖を停止させると考えられる。

継代前期細胞の高圧酸素障害の回復に及ぼす阻害剤の影響を見た実験から回復過程にDNA合成は関与せず、タンパク質合成が必要であることが明らかになった。この結果は電離放射線¹¹²⁾や紫外線¹¹⁴⁾による障害の回復にDNA合成が必要でタンパク質合成は関与しないという実験報告と異なり、高圧酸素障害を修復する機構は電離放射線や紫外線障害を修復する機構と異なるものと考えられる。高圧酸素の場合、損傷を受けたDNAが、DNA合成が関与する過程で修復されるものよりも、酸化され機能が低下したタンパク質が新たなタンパク質合成で取って変わる過程で障害が修復されると考えられる。タンパク質の酸化障害でよく知られているものとして混合ジスルフィド形成がある。酸化的ストレスを受けてタンパク質中のSH基がジスルフィド結合でGSHと結合する¹¹⁵⁾。混合ジスルフィド形成により酵素活性が低下する例は多数知られ¹¹⁶⁾、また細胞機能の低下が引き起こされることも知られている¹¹⁷⁾。

第4章 細胞内GSH濃度と酸素毒性

細胞の持つ活性酸素に対する防御能を実験的に改変させた時の試験管内老化現象への影響を明らかにするための基礎実験を行った。

GSHは γ -Glu-Cys-Glyの構造を持つトリペプチドでグルタチオンペルオキシダーゼの補酵素として過酸化水素や過酸化脂質などの生体に有毒な過酸化物の還元に関与している⁹⁴⁾。またGSHは細胞内でもっとも高濃度の還元剤として直接スーパーオキシドラジカルや過酸化水素などの活性酸素を還元し自身は酸化されGSSGとなる⁹⁴⁾。GSSGはNADPHを電子供与体としてグルタチオン還元酵素によりGSHに戻される⁹⁴⁾か細胞外に輸送される¹¹⁸⁾。このグルタチオン系はSODとともに活性酸素に対する重要な防御系であると考えられている。細胞内GSH濃度を改変する方法がMeisterらにより開発されてきた¹¹⁹⁾。著者はそれらの手法を培養ヒト正常線維芽細胞に適用し、そのうちのいくつかの方法が実際に細胞内GSH濃度を変えることを確かめた。細胞内GSH濃度が改変された時の活性酸素に対する防御能の変化を明らかにするために、高圧酸素障害への影響を調べた。

第1節 細胞内GSH濃度の低下とその高圧酸素毒性への影響

(実験結果)

ジエチルマレイン酸 (DEM) を培養液に添加し2時間培養するとヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) のGSH濃度がDEMの濃度 (0.5-1

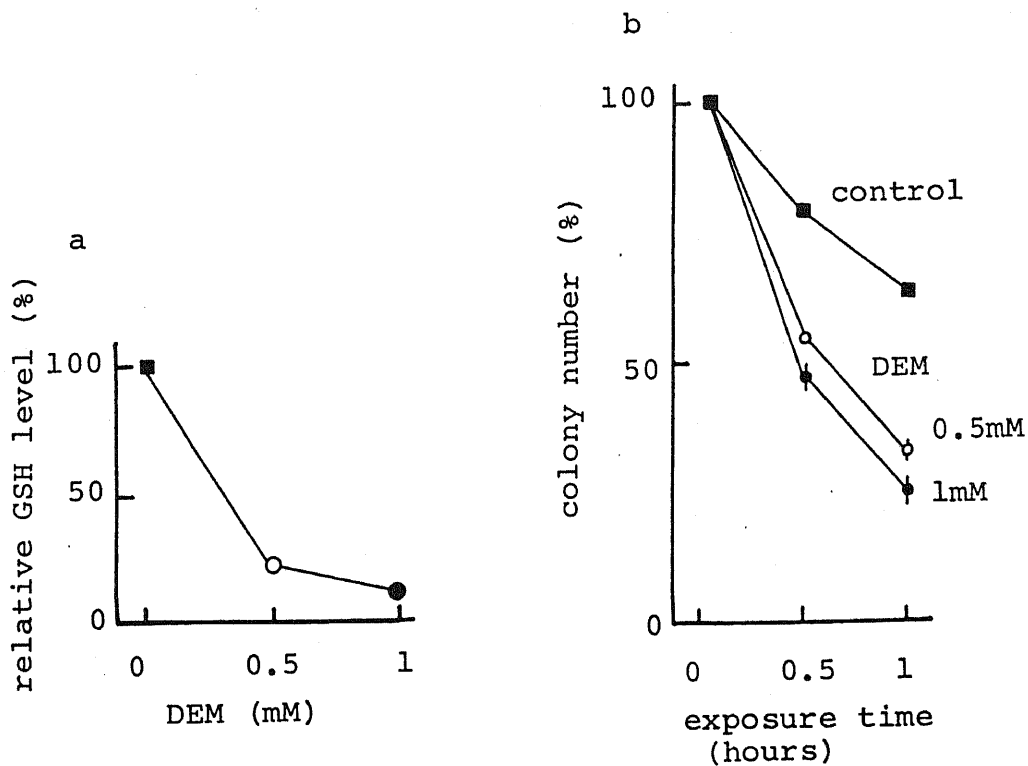


図 2 2 DEMのヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度と高圧酸素毒性に及ぼす影響

(DEMを含む培養液でヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) を2時間処理した時の細胞内GSH濃度 (a) とその後30気圧酸素を曝露した時のコロニー形成数を測定した。)

mM) に応じて低下した (図 22a)。GSH合成酵素の阻害剤のL-ブチオニン-R,S-スルホキシミン (BSO) を培養液に添加し24時間培養すると細胞内GSH濃度がBSOの濃度 (2-10 μ M) に応じて低下した (図 23a)。

DEMおよびBSOで前処理し、細胞内GSH濃度を低下させた細胞に30気圧を0.5または1時間曝露しコロニー形成数を測定した。高圧酸素曝露によりその時間に応じてコロニー形成数が低下した。この低下はDEMおよびBSO前処理で、その添加濃度に応じて促進された (図 22b、23b)。

次に、BSO10 μ M、12時間処理後BSOを除いて培養した時の細胞内GSH濃度の回復を調べ、高圧酸素曝露後のコロニー形成数を検討した。BSO処理後BSOを除いて培養すると細胞内GSH濃度は経時的に対照のレベルに回復し (図 24a)、高圧酸素曝露後のコロニー形成数も対照のレベルに戻った (図 24b)。

第2節 細胞内GSH濃度の増大とその高圧酸素毒性への影響

(実験方法)

L-2-オキソチアゾリジン-4-カルボン酸ナトリウム (OTC) の合成はBoettcher & Meisterの方法に従った¹²⁰⁾。グルタチオンエチルエステル (γ -グルタミル-システイニルグリシンエチルエステル) の合成はAndersonらの方法に従った¹²¹⁾。

グルタチオンエチルエステルを培養液に添加する場合は、血清中にあるエステル基を加水分解するエステラーゼを不活化するために、血清は65°Cで0.5時間熱処理して用いた。

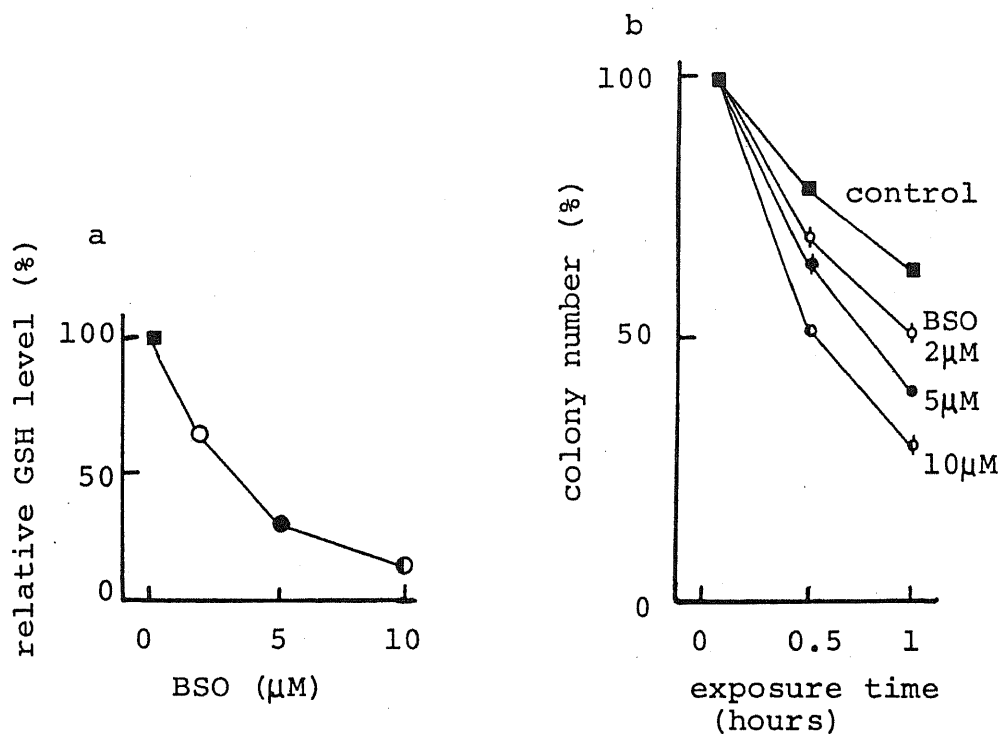


図 2 3 BSOのヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度と高圧酸素毒性に及ぼす影響

(BSOのヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) を24時間処理した時の細胞内GSH濃度 (a) とその後30気圧酸素を曝露した時のコロニー形成数を測定した。)

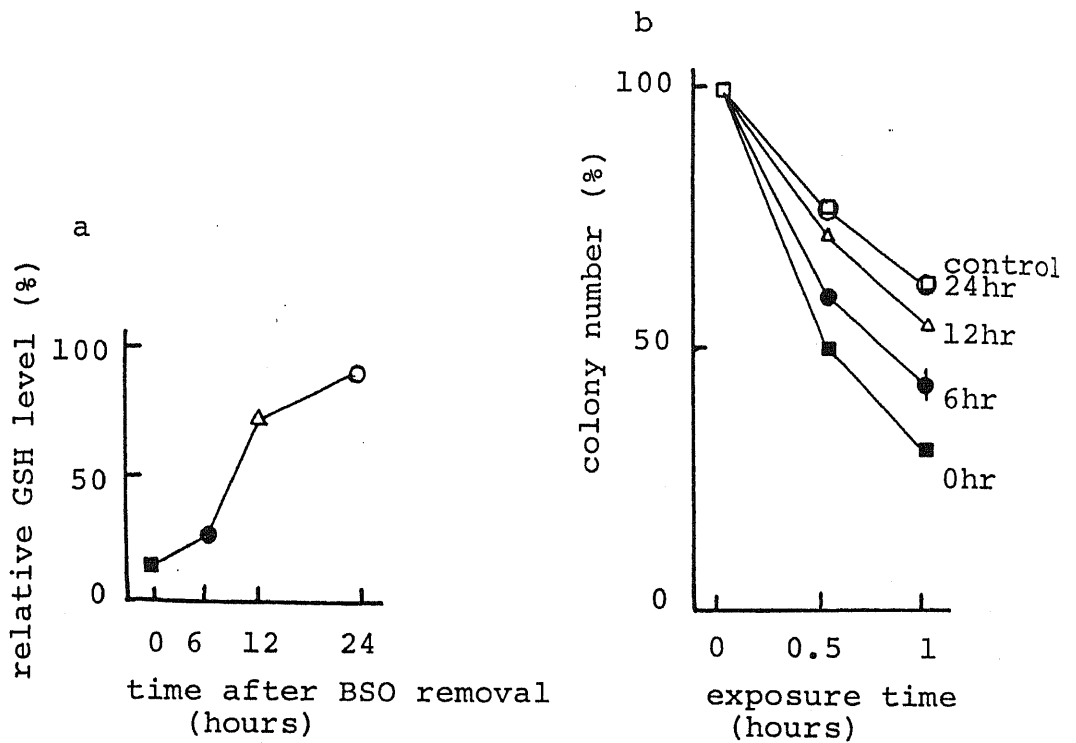


図 2 4 BSO除去後のヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度と高圧酸素毒性

BSO 10 μ Mをヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に12時間処理した後、BSOを含まない培養液で培養した時の細胞内GSH濃度と30気圧酸素曝露でのコロニー形成数を測定した。

(実験結果)

GSHおよびGSSGを培養液に加えて培養してもヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度の増大は見られなかった。他の細胞で細胞内GSH濃度の増大が報告されている CoCl_2 ¹²²⁾や2-メルカプトエタノール¹²³⁾、OTC¹²⁴⁾の添加ではヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度の増大は確認できなかった。5-10mMのグルタチオンエチルエステルを培養液に添加すると細胞内GSH濃度が18-21%高くなった(図25a)。N-アセチルシステイン(AC)を培養液に添加して培養すると濃度に応じて(2-10mM)、細胞内GSH濃度が7-26%増大した(図26a)。

グルタチオンエチルエステルを4時間およびACを3日処理して細胞内GSH濃度が増大した細胞に30気圧酸素を0.5および1時間曝露しコロニー形成数を測定した。高圧酸素によるコロニー形成の減少がグルタチオンエチルエステルおよびACの前処理によりその濃度に応じて阻害された(図25b、26b)。

第3節 考察

細胞内GSH濃度を低下させる手段としてDEMおよびBSOがよく用いられる。培養ヒト正常線維芽細胞でも両者とも細胞内GSH濃度を低下させた。DEMは直接GSHと反応するため、短時間で細胞内GSH濃度を低下できるが、反応はGSHだけに特異的ではなく、グリコーゲン代謝やタンパク質合成にも影響を与える¹²⁵⁾。BSOはGSHの合成を阻害し、すでに存在しているGSHには影響がないため細胞内GSH濃度が低下するのに時間がかかるが、GSH合成を特

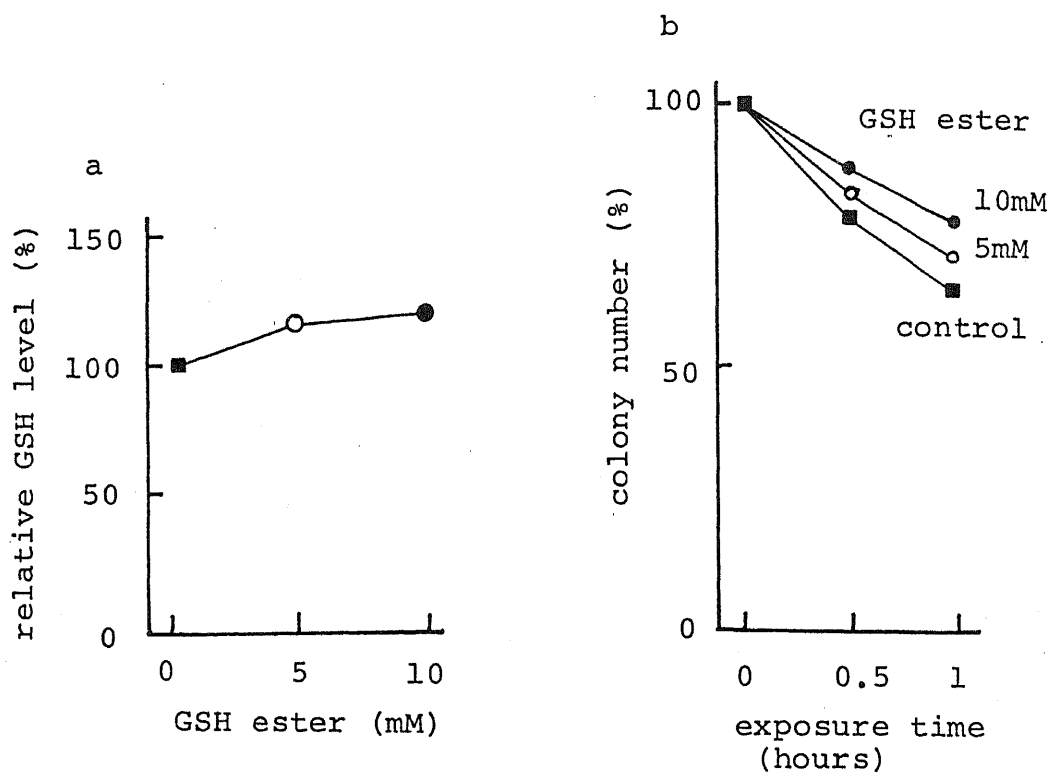


図 25 グルタチオンエチルエステルの正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度と高圧酸素毒性に及ぼす影響

（グルタチオンエチルエステルをヒト正常線維芽細胞（TIG-1）に4時間処理した時の細胞内GSH濃度と、その後30気圧酸素を曝露した時のコロニー形成数を測定した。）

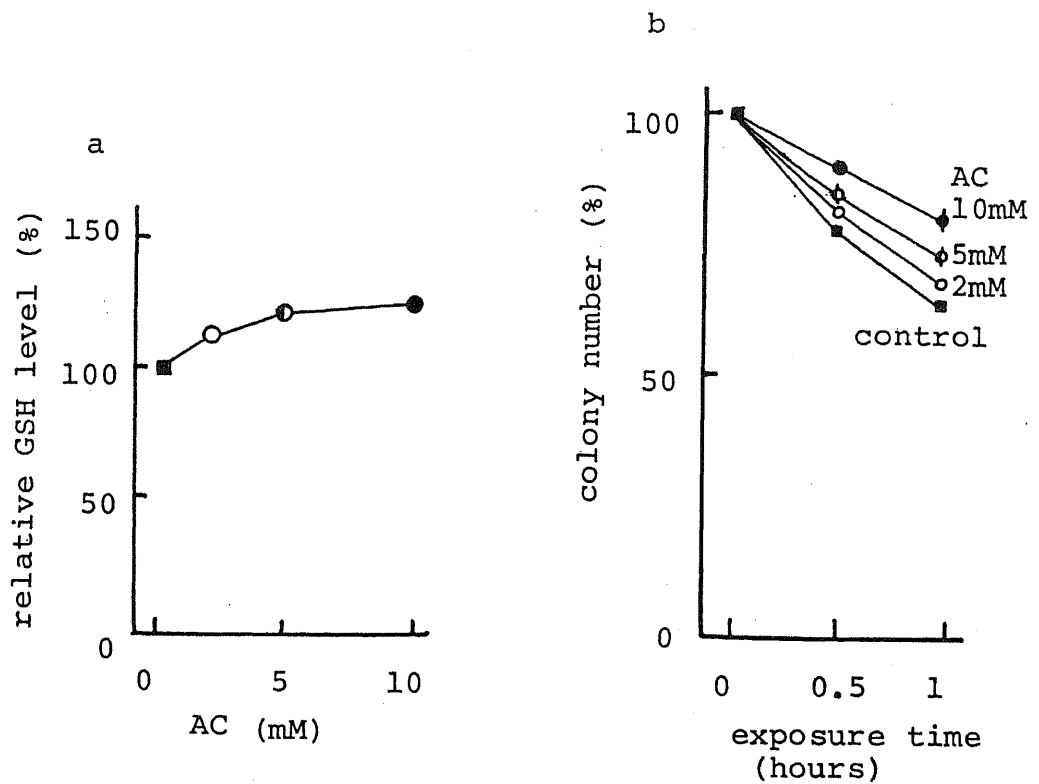


図 2 6 ACのヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度と高圧酸素毒性に及ぼす影響

（ACをヒト正常線維芽細胞（TIG-1）に3日間処理した時の細胞内GSH濃度と、その後30気圧酸素を曝露した時のコロニー形成数を測定した。）

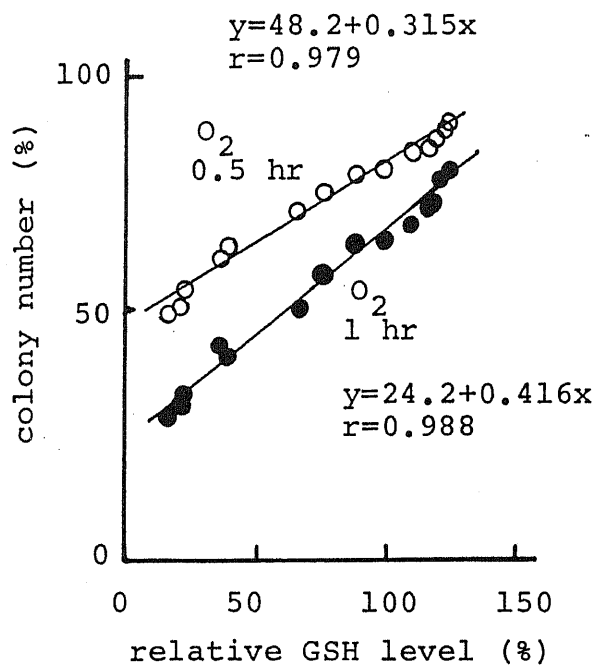


図 2 7 細胞内 GSH 濃度と高圧酸素曝露後のコロニー形成能

(種々の処理を行った時の細胞内 GSH 濃度に対し処理後、30 気圧酸素を曝露した時のコロニー形成数の割合を図示した。)

異的に阻害すると考えられている¹¹⁹⁾。GSHを培養液に添加しても細胞内GSH濃度は増大しないがグルタチオンエチルエステルの添加では他の系¹²¹⁾と同様、細胞内GSH濃度の増大が見られた。これはエステル化されたグルタチオンは膜透過性が高く、細胞内に入ってエステル基が加水分解を受けてはずれGSH濃度が増大すると説明されている¹²¹⁾。しかし血清中にあるエステラーゼを不活化するために血清を熱処理する必要がある、長期的影響を調べるには不向きである。ACによる細胞内GSH濃度の増大が他の系¹²⁶⁾と同様に培養ヒト正常線維芽細胞でも見られた。ACによる細胞内GSHの増大は、細胞内に取り込まれたACのアセチル基が切断されて生成されたシステインを基質としてGSH合成酵素でGSHが生成されるためと説明されている¹²⁷⁾。

BSOおよびDEM処理により細胞内GSH濃度が低下するとともに高圧酸素感受性が増大した。BSO処理後BSOを除いた培養すると細胞内GSH濃度が回復するが、それとともに高圧酸素感受性も非処理の細胞の高圧酸素感受性と同様にまで回復した。ACおよびグルタチオンエチルエステル処理により細胞内GSH濃度が増大するとともに高圧酸素感受性が低下した。図27は、以上の結果をもとに、各実験での細胞内GSH濃度を横軸に高圧酸素を曝露した時のコロニー形成数の割合を縦軸にしてまとめたものである。30気圧酸素0.5時間の場合も1時間の場合も細胞内GSH濃度と高圧酸素曝露後のコロニー形成能は有意に相関した($p < 0.05$)。この結果は細胞内GSH濃度は高圧酸素による障害の防御に関与していることを示している。そしてこの様に細胞内GSH濃度を低下および増大させると細胞の活性酸素に対する防御能が低下および増大

することが示唆される。

第5章 細胞内GSH濃度の試験管内細胞老化に及ぼす影響

通常の酸素濃度下でも細胞内で活性酸素が生成されており、細胞はそれらに対する防御機構で障害を抑制していると考えられている⁹⁰⁾。活性酸素に対する防御能を実験的に低下および増大させれば活性酸素による障害の蓄積が逆に増加および減少するはずである。活性酸素による障害の蓄積が試験管内老化現象の原因であるならば活性酸素に対する防御能を改変すれば試験管内細胞老化に影響するはずである。そこで細胞内GSHを低下または増大させる条件で継代培養を行い試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下と寿命を調べた。

第1節 細胞内GSH濃度低下の試験管内老化へ及ぼす影響

(実験結果)

BSOを2または5 μ M含有した培養液にてヒト正常線維芽細胞をPD25より継代培養した。3日間培養しても、5週間培養してもBSOの濃度に依存して細胞内GSH濃度が低下していた(図28)。図29に示すように非添加の対照の細胞はPD62より細胞増殖が低下し、PD68にて細胞増殖が停止したのに対し、BSO 2 μ MではPD57より細胞増殖が低下し、PD60にて細胞増殖が停止した。さらにBSO 5 μ MではPD48より細胞増殖が低下し、PD51にて細胞増殖が停止した。図32に培養液中のBSO濃度に対し細胞寿命の低下を図示した(6例の平均)。この結果はBSOにより細胞内GSH濃度を減少させると試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下が早く現れ、

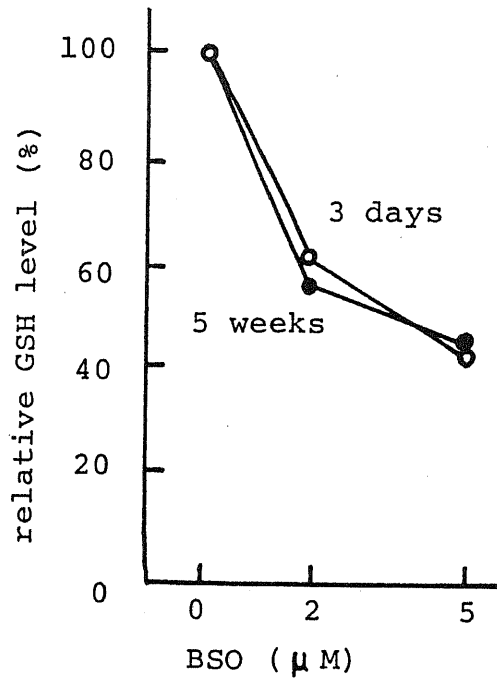


図 2 8 BSOのヒト正常線維芽細胞の細胞内GSHに及ぼす影響

(BSO含有培養液でヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) をPD25より培養し3日目および5回継代した5週間目の細胞内GSH濃度を図示した。)

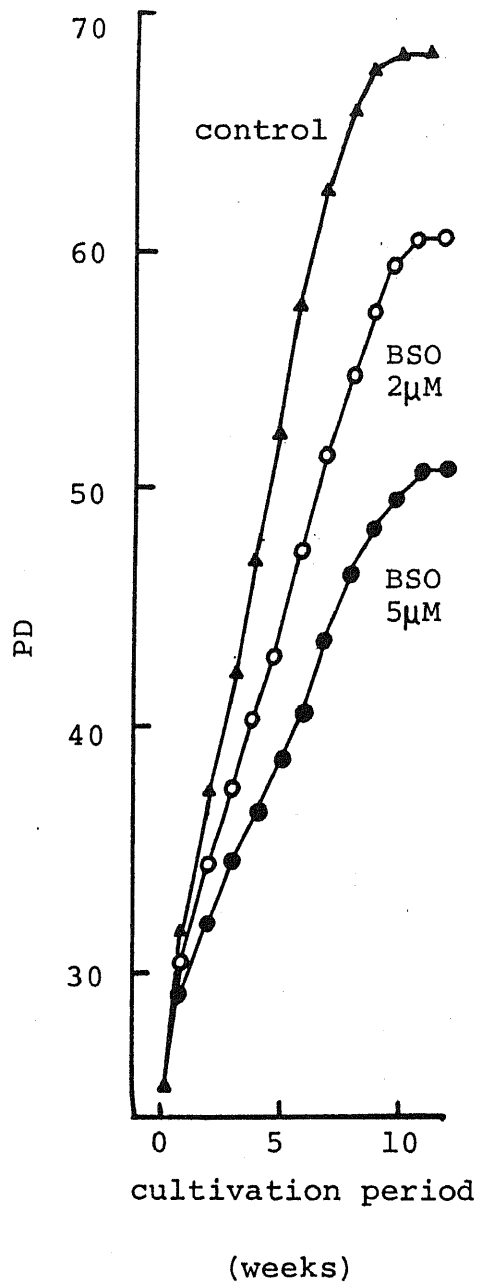


図 2 9 BSOのヒト正常線維芽細胞の試験管内老化への影響

寿命が短縮することを示す。

第2節 細胞内GSH濃度増大の試験管内老化へ及ぼす影響

(実験結果)

ACを2または5mM含有した培養液でヒト正常線維芽細胞をPD25より継代培養した。3日間培養しても、5週間培養しても細胞内GSH濃度の増大がACの濃度に依存して見られた(図30)。図31に示すように非添加の対照の細胞はPD62より細胞増殖が低下し、PD68にて細胞増殖が停止したのに対しAC 2mMではPD70より細胞増殖が低下し、PD74にて細胞増殖が停止した。さらにAC 5mMではPD72より細胞増殖が低下し、PD78にて細胞増殖が停止した。図32に培養液のAC濃度に対し細胞寿命を図示した(6例の平均)。この結果はACにて細胞内GSHを増加させると試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下が遅く起き、寿命が延長することを示す。

第3節 考察

BS0によりヒト正常線維芽細胞の試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下が早く現れ、寿命が短縮した。一方、ACでは試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下が遅く起き、寿命が延長することが示された。この現象は、BS0により細胞内GSH濃度が低下しACにより増加することから、細胞内GSH濃度を改変したために老化速度が変化したためと考えられる。図33に細胞内GSH濃度に対し細胞寿命を図示し、これらの相関を示す。細胞内GSH濃度は第4章

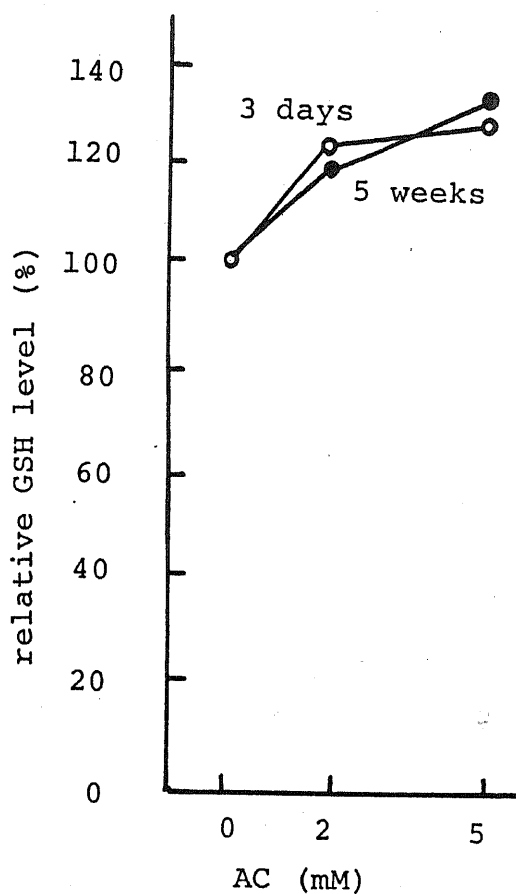


図30 ACのヒト正常線維芽細胞の細胞内GSH濃度への影響

(AC含有培養液でヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) をPD25より培養し
3日目および5回継代した5週間目の細胞内GSH濃度を図示した。)

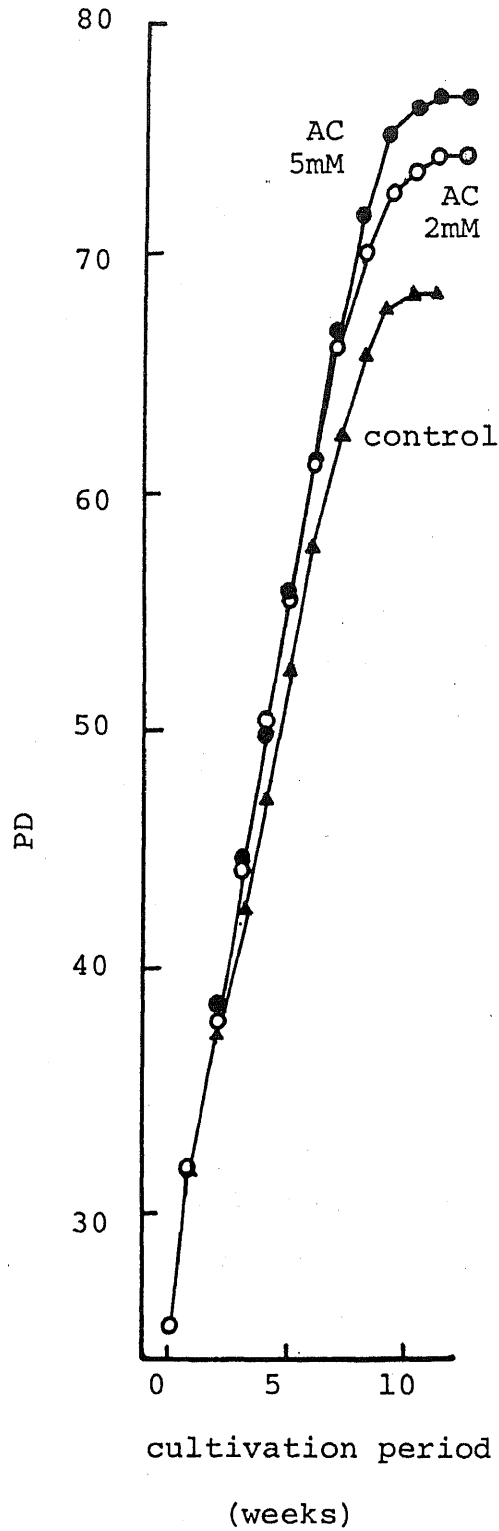


図 3 1 ACのヒト正常線維芽細胞の試験管内老化への影響

で示したように高圧酸素毒性の感受性に影響を与える。また過酸化水素¹²⁴⁾や電離放射線¹²⁸⁾の感受性にも影響を与えることが知られている。電離放射線により種々の活性酸素が生成されること¹⁰⁷⁾からも、細胞内GSHは活性酸素による細胞障害の防御に関与していることが示唆される。グルタチオン系はSODとともに細胞の活性酸素に対する防御に重要な役割を担っていると考えられる。細胞内GSH濃度の変化はグルタチオン系による活性酸素の防御能に影響を及ぼしていると考えられる。通常は細胞内では活性酸素の生成と防御の平衡が成立していると考えられている。防御能を上回った活性酸素の生成は細胞に障害を与える。防御能を改変すれば活性酸素による障害が変化するはずであり、本章の実験結果は、防御機構を逃れた活性酸素による障害の蓄積が老化の原因であるとする説を支持するものである。

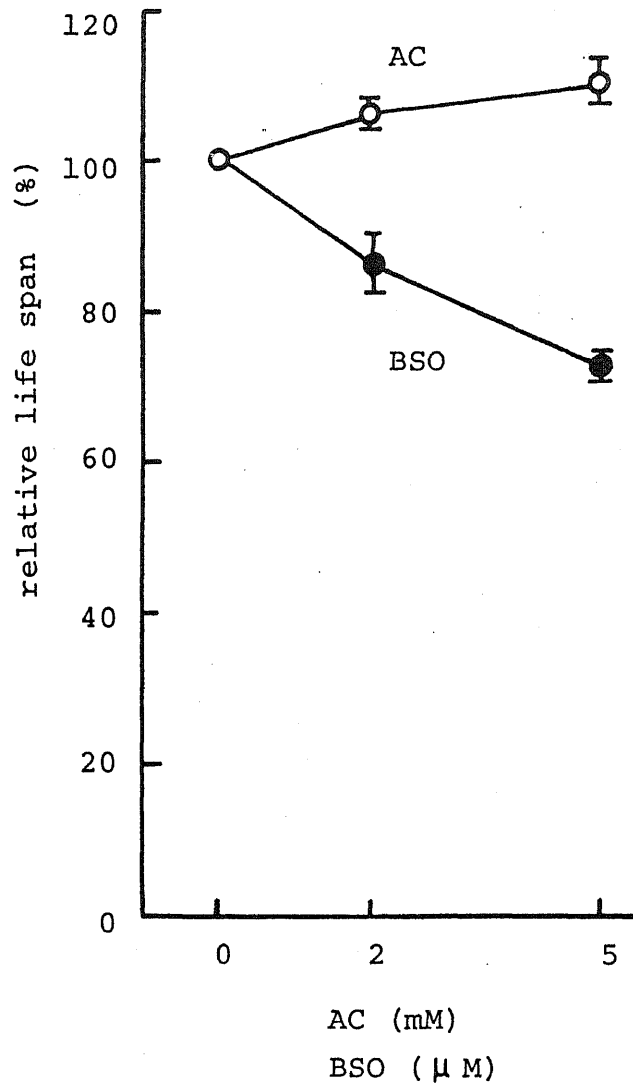


図 3 2 BSOおよびACの試験管内細胞寿命の影響

(BSOおよびAC含有培養液で継代培養したヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) の試験管内寿命を図示した。)

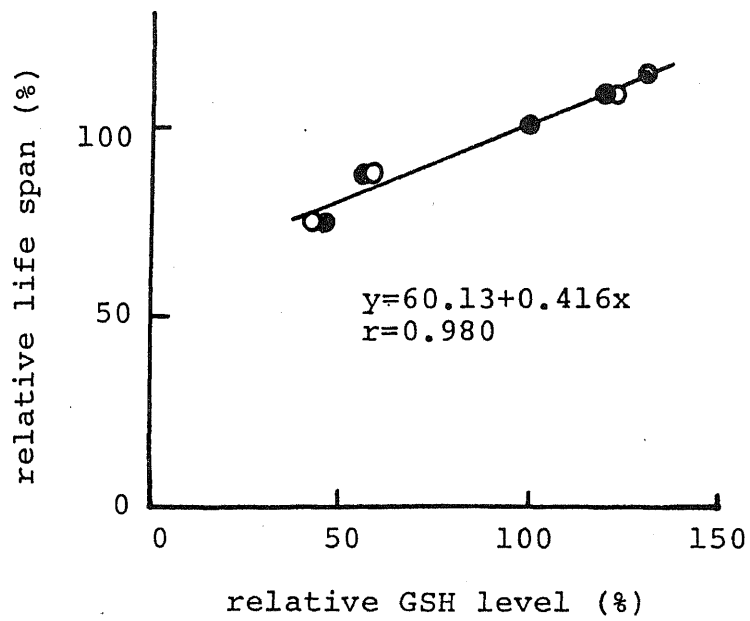


図 3 3 細胞内 GSH 濃度と試験管内細胞寿命

第6章 総括的考察

細胞の老化は個体の老化の一因を成していると考えられている¹⁹⁾が、個体内の細胞の老化を研究するには多くの困難が伴う。Hayflickらが1961年に発見したヒト正常線維芽細胞の試験管内老化現象は、ヒトの組織から単離した正常細胞を継代培養すると、ある細胞分裂回数を経ると細胞増殖が低下しついには細胞増殖が停止するというものである²⁰⁾。この系は細胞は組織内の様に神経系や内分泌系の支配もなく、種々の制御された実験が可能であり、細胞老化を研究する優れた実験系である。しかし、試験管内老化現象の発見から30年近く経ってもその原因は不明のままであった。著者はこの系を用いて老化のフリーラジカル説を検証しようと試みた。この説は生体は通常酸素濃度においても常に酸化ストレスを受け、酸素が活性化され、生成された種々の酸素フリーラジカル（活性酸素）が生体構成成分を酸化しておりその長期的な蓄積が老化の原因であるというものである⁵¹⁾。他の体細胞突然変異説⁹⁾や誤り破綻説⁴³⁾など、いくつかの仮説はそれぞれ致命的な批判を浴びせられていた（序章）。しかし老化のフリーラジカル説は試験管内細胞老化の系で否定的にも肯定的にも検証されてはいなかった。

種々の系で細胞内でスーパーオキシドラジカルなどの活性酸素が生成されていることが示されている⁷⁴⁾。細胞はこれらの活性酸素を消去するためにSODやグルタチオン系などの防御系を備え、活性酸素の生成と防御の平衡が成立していると考えられる。老化のフリーラジカル説は、通常の状態ではこれらの防御系を逃

れた活性酸素がわずかづつでも生体構成成分に障害を与えその長期的蓄積が老化の原因であるとするわけである。

老化のフリーラジカル説をヒト正常線維芽細胞の試験管内老化の系で検証するために設定した第一の課題は活性酸素がその防御能を上まわって生成された場合、試験管内老化が促進されることを確認することである。第二の課題は活性酸素に対する防御能を増大させた場合、試験管内老化が遅延することを確認することである。防御能が増大すれば通常の状態では生成されて防御系から逃れる活性酸素が少なくなるはずであるからである。第三の課題は逆に活性酸素に対する防御能を低下させた場合、試験管内老化が促進されることを確認することである。防御能が低下すれば通常の状態では生成されて防御系から逃れる活性酸素が多くなるはずであるからである。

第一の課題のための細胞内での活性酸素の生成を増大させる酸化ストレスとして高圧酸素を細胞に曝露する系を用いた。他の酸化ストレスとしてオゾン曝露や電離放射線や光照射、パラコートやメナジオン、ジアミドなどの培養液への添加などの方法がある。薬(毒)物を用いた場合、活性酸素ではなく化合物自体の毒性の問題があり、電離放射線の場合直接のDNA切断の問題がある。高圧酸素は、通常酸素濃度で生成される種々の活性酸素がそれぞれ増幅して生成されることが期待される。高圧酸素や高分圧酸素の曝露では活性酸素の一種、スーパーオキシドラジカルが生成されること⁷⁴⁾やそれらによる障害の防御にスーパーオキシドラジカルを代謝するSODが関与していることが明らかになっている⁹⁰⁾。培養ヒト正常線維芽細胞においても、

SODの阻害剤であるDDCの前処理で高圧酸素による障害が増大することを明らかにし、高圧酸素により細胞内でスーパーオキシドラジカルの生成されることが示唆された。またGSHはそれ自身スーパーオキシドラジカルや過酸化水素などの活性酸素と反応し、またグルタチオンペルオキシダーゼの補酵素として過酸化物の解毒に関与する。そのため細胞内で活性酸素が生成されれば細胞内GSH濃度が低下するはずであるが、培養ヒト正常線維芽細胞に高圧酸素を曝露すると実際に細胞内GSH濃度が低下することが明らかになったことから、やはり高圧酸素により細胞内に活性酸素が生成されることが示唆された。

ヒト正常線維芽細胞に高圧酸素を曝露し試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下と細胞容積の増大、細胞の寿命を調べた。継代後期の細胞に高圧酸素を曝露した場合、試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下と細胞容積の増大が早く起き、寿命が短縮された。継代前期の細胞は継代後期の細胞に比べ高圧酸素に対し感受性が低く、高圧酸素による障害の修復能も高く、継代前期の細胞に高圧酸素を曝露しても細胞の寿命短縮は見られなかった。活性酸素により試験管内加齢の継代後期から老衰期の過程が速く進むことが示唆された。

第二の課題での活性酸素防御系の増大のためにはACの培養液への添加により細胞内GSH濃度を増大させる方法を用いた。細胞内GSHが過酸化水素や電離放射線など種々の酸化ストレスの防御に関係していることが知られている⁹⁴⁾。著者は細胞内GSHが高圧酸素障害の防御に関与していることを示した。通常の酸素濃度（大気95%-二酸化炭素5%）にてヒト正常線維芽細胞をAC含

有培養液と非含有培養液とで継代培養し試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下の起こるPDおよび細胞寿命を比較した。ACの濃度に応じて細胞内GSH濃度が増大し活性酸素に対する防御能が増大していると考えられるが、試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下が起こるPDもACの濃度に応じて遅くなり細胞寿命も延長された。この結果は活性酸素に対する防御能を増大させると試験管内老化の速度が遅くなることを示す。

第三の課題での活性酸素防御系の低下のためにはBSOの培養液への添加により細胞内GSH濃度を低下させる方法を用いた。通常の酸素濃度にてヒト正常線維芽細胞をBSO含有培養液と非含有培養液とで継代培養し試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下の起こるPDおよび細胞寿命を比較した。BSOの濃度に応じて細胞内GSH濃度が減少し活性酸素に対する防御能も低下していると考えられるが、試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下が起こるPDもBSOの濃度に応じて早くなり細胞寿命も短縮された。この結果は活性酸素に対する防御能を低下させると試験管内老化の速度が速くなることを示す。

老化のフリーラジカル説を検証するために設定した三つの課題に対するそれぞれの解答はこの説を支持する形で示された。高圧酸素を継代後期の細胞に曝露すると寿命が短縮されることや継代後期の細胞は高圧酸素による障害を修復する能力が低下していることから、特に継代後期から老衰期に進む加齢過程で活性酸素が強く関与することが考えられる。老衰期に示される細胞の特徴は細胞増殖の低下であり、またDNA合成能の低下³⁹⁾や細胞周期上ではG₁期からS期への移行の阻害¹²⁹⁾、細胞容積の

増大⁴⁰⁾、染色体の異常¹⁰⁹⁾、および自家蛍光物質の蓄積⁴¹⁾などである。高圧酸素により細胞増殖の低下やDNA合成の低下、細胞周期上ではG₁期からS期への移行の阻害、細胞容積の増大が起きることが明らかになった。また酸素により染色体の異常が起きることが報告されている¹¹⁰⁾。自家蛍光物質は過酸化物によることが示唆されており¹¹¹⁾、上記の老衰期での細胞の変化はすべて活性酸素によって生じ得るものであることは興味深い。

試験管内で一定の細胞分裂回数を経ると老化現象が起こるためには細胞分裂の度に細胞内に細胞分裂回数を刻む機構がなければならぬ。DNA合成のためのデオキシリボヌクレオチドを生成するためにリボヌクレオチドを短期間に大量に還元しなければならぬがそのためにグルタレドキシニン-GSH系が使われGSHやNADPHが消費される¹³⁰⁾。実際にヒト癌細胞ではS期（DNA合成期）の直前からS期の初期に非タンパク質SH量が低下することが見いだされている¹³¹⁾。培養ヒト正常線維芽細胞でS期初期に高圧酸素を曝露するとS期の進行が停止することを示したが、著者はさらにヒト癌細胞を同調培養し細胞周期の各時期での高圧酸素感受性を調べ他に発表した¹³²⁾。特にS期の初期に高圧酸素の感受性が著しく高かった。これらの結果はS期初期に活性酸素による障害を受け易くなっていることを示唆する。活性酸素が細胞分裂を経る度にこの感受性の高い時期に障害を与え細胞分裂回数を刻むという機構も考えられる。

ヒト正常線維芽細胞の試験管内老化現象の機構として老化のフリーラジカル説を支持する実験結果を得た。個体の組織内の細胞も活性酸素により老化する可能性は十分考えられる。もし

この可能性が正しければ活性酸素は臓器の機能を低下させ個体の死の確率を高め、寿命を決定する重要な因子となるであろう。食事量の制限をすると寿命が延長すること¹³³⁾および変温動物では低温で寿命が長いこと¹³⁴⁾、またイエバエでは運動量と寿命が逆相関すること¹³⁵⁾が知られている。これらの現象は代謝速度すなわち酸素消費速度が寿命を規定している因子と考えられるものである¹³⁶⁾が、より直接的な因子は活性酸素ではないだろうか。Tolmasoffらは種々の動物のSODの比活性がその動物の最大寿命と相関することを示し、寿命決定における活性酸素の関与を示唆した¹³⁷⁾。種々の老人病に関与する虚血による細胞障害¹³⁸⁾や白内障⁷⁹⁾、パーキンソン病¹³⁹⁾の成因に活性酸素の関与が示唆されている。本論文で述べた老化を研究する方法論は血管やレンズ、骨、リンパ球など個体の老化を探る上で重要な細胞の試験管内老化や、個体の寿命や老人病の研究にも応用されよう。実際にBSOをラットに注射し老人病の一つである白内障を誘発させる試みも成されている^{140, 141)}。

総括

ヒト正常線維芽細胞の試験管内老化現象の原因は全く不明であった。本研究は、酸素代謝に伴って生成する酸素フリーラジカル（活性酸素）が生体構成成分を非特異的に酸化し、その障害の長期にわたる蓄積が老化の原因であるとする老化のフリーラジカル説を、試験管内細胞老化の系で検証することを目的とした。そのために細胞内に活性酸素の生成を実験的に増大させたとき、および活性酸素に対する防御能を増大または低下させたときの試験管内の老化に及ぼす影響の解明を試みた。細胞内に活性酸素を生成させる手段として高圧酸素曝露を用い、その試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下と寿命に及ぼす影響を調べた。細胞内GSH濃度が高圧酸素による障害の防御に関与していることから細胞内GSH濃度が活性酸素の防御に関わることを示し、細胞内GSH濃度を増大または低下させて試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下と寿命に及ぼす影響を調べた。

（1）ヒト正常線維芽細胞の試験管内加齢に伴う高圧酸素感受性の変化

ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞を継代培養すると活発な細胞増殖期を経た後、PD50-60より細胞増殖が低下し、PD56-68にて増殖の停止が起こり試験管内老化現象が確認された。

この細胞への高圧酸素曝露の影響を調べた。細胞数の増加の阻害、コロニー形成数の減少およびDNA合成の抑制が見られた。高圧窒素曝露では影響がないことから、この細胞障害は圧力自身によるものではなく、酸素毒性によるものであることが明らか

かになった。細胞周期への影響をフローサイトメトリーにより調べたところ、高圧酸素はG₁期からS期への移行およびS期の進行を阻害した。G₂期からM期を経てG₁期への移行は阻害せず、特にDNA合成に及ぼす影響が大きいことが明らかになった。タンパク質合成は阻害せず、細胞容積が増大した。活性酸素に対する防御系の一つと考えられているSODの阻害剤であるDDCで細胞を前処理すると高圧酸素曝露によるコロニー形成の阻害が促進された。また活性酸素に対するもう一つの防御系グルタチオン系の構成成分であるGSHの細胞内濃度が高圧酸素曝露後に低下した。これらの結果は高圧酸素による培養ヒト線維芽細胞の障害は活性酸素によることを示唆した。試験管内加齢に伴う高圧酸素感受性の変化を調べるために、種々の継代回数の細胞に高圧酸素を曝露しコロニー形成能に及ぼす影響を比較した。継代後期の細胞の高圧酸素に対する感受性は継代前期の細胞に比べて高く、試験管内加齢に伴って活性酸素による障害を受け易くなることが示唆された。しかし細胞のSOD活性及びGSH濃度の継代後期での低下は認められなかった。

(2) 高圧酸素曝露による試験管内加齢に伴う増殖低下の促進と寿命の短縮

活性酸素の細胞内での生成を実験的に増大させたときの試験管内の老化に及ぼす影響を解明するために、高圧酸素を曝露したときの試験管内加齢に伴う細胞増殖の低下と寿命を調べた。継代前期細胞では高圧酸素を1週間に1時間づつ7回曝露しても寿命短縮は見られなかった。一方、継代後期細胞では高圧酸素を1週に1時間づつ2回曝露すると試験管内加齢に伴う増殖低下が早

く起き寿命が短縮した。試験管内加齢に伴って細胞容積が増大することが知られているが、継代後期細胞に高圧酸素を曝露すると細胞容積の増大が早く現れた。この結果は試験管内加齢が進むと活性酸素が加齢に伴う機能障害の出現を促進することを示唆する。

(3) 細胞加齢に伴う高圧酸素障害の修復能の変化

活性酸素による障害が細胞内に蓄積するものか、それとも細胞はそれらを修復することができるのか、またその修復能力が試験管内加齢に伴ってどの様に変化するかを明らかにするために、高圧酸素曝露によって引き起こされた、コロニー形成能とDNA合成能の低下の回復を継代前期細胞と継代後期細胞とで比較した。高圧酸素曝露直後では継代前期細胞も継代後期細胞もコロニー形成能とDNA合成能の低下が見られるが、酸素曝露後、低濃度血清含有培地にて増殖を停止させる条件下に置くと継代前期細胞では1ないし2日後にはコロニー形成能とDNA合成能は完全に回復するが、継代後期細胞では3日経っても回復が見られない。この結果は加齢に伴って活性酸素による障害を修復する能力が低下することを示唆する。

(4) 細胞内GSH濃度と酸素毒性

細胞内GSH濃度を変化させることによりGSHの活性酸素に対する防御への関与を調べた。細胞内GSH濃度を低下させるためには、GSH合成酵素阻害剤であるBSOを培養液に添加することによった。BSOの濃度に応じて細胞内GSH濃度が低下した。一方、培養液にグルタチオン（還元型及び酸化型）を添加しても細胞内GSH濃度の増大は見られず、細胞内GSH濃度を増大させるには、GSHの前

駆体システインの細胞内濃度を増大させることが知られているACを培養液に添加することによつた。ACの濃度に応じて細胞内GSH濃度が増大した。高圧酸素の曝露によりコロニー形成能が低下する系を、活性酸素による細胞障害のモデルとして用いた。BSOの前処理により、その濃度に応じて高圧酸素曝露によるコロニー形成能の低下が促進された。一方、ACの前処理により、その濃度に応じて高圧酸素曝露によるコロニー形成能の低下が抑えられた。またDEMにより細胞内GSH濃度を低下させても高圧酸素曝露によるコロニー形成能の低下が促進された。グルタチオンエチルエステルにより細胞内GSH濃度を増大させても高圧酸素曝露によるコロニー形成能の低下が抑えられた。高圧酸素曝露前の細胞内GSH濃度と高圧酸素曝露後のコロニー形成能が正に相関した。この結果は細胞内GSHが、細胞内で生成される活性酸素の障害に対する防御に関与していることを示唆する。

(5) 細胞内GSH濃度の試験管内加齢に伴う増殖低下と寿命に及ぼす影響

活性酸素に対する防御能を実験的に改変させた時の試験管内老化への影響を明らかにするために、細胞内GSH濃度を低下または増大させる条件で継代培養を行い試験管内加齢に伴う増殖の低下と寿命を調べた。BSOを含む培養液にて継代を続け、細胞内GSH濃度を低下させた。BSO濃度に応じて対照に比べて寿命が短縮した。一方、ACを含む培養液にて継代を続け細胞内GSH濃度を増大させたところ、AC濃度に応じて対照に比べて寿命が延長した。この結果は細胞内GSH濃度を通常よりも低下させると寿命が短縮し、増大させると延長することを示しており、活性酸素の

障害に対する防御能が寿命の決定に関与していることを示唆する。

以上の結果は、活性酸素の生成を特に継代後期の細胞で増大させると試験管内の老化が促進されること、活性酸素に対する防御能を増大させると老化を遅くすることができ、逆に防御能を低下させると老化が促進されることを示唆し、細胞内で通常の酸素代謝にともなって生成された活性酸素による障害が蓄積されて試験管内老化現象が引き起こされるとする説を支持するものであり、老化の機構を解明する上で有意義なものと考えられる。

掲載雑誌目録

第1章の内容はMechanism of Ageing and Development 12 31-37 (1980) に下記の標題で掲載されたものである。

The sensitivity to hyperbaric oxygen of human diploid fibroblasts during ageing in vitro

第2章の内容はExperimental Gerontology 18 339-345 (1983) に下記の標題で掲載されたものである。

Shortening of the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts exposed to hyperbaric oxygen

第3章の内容はMechanism of Ageing and Development 40 81-87 (1987) に下記の標題で掲載されたものである。

Lack of recovery from oxygen-induced damage to colony formation and DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts

第4章の内容はBiochemistry International 18 439-446 (1989) に下記の標題で掲載されたものである。

Protective effect of glutathione against oxygen-induced growth inhibition of human diploid fibroblasts

第5章の内容はExperimental Gerontology 23 81-86 (1988) に下記の標題で掲載されたものである。

Relationships between the cellular glutathione level and in vitro life span of human diploid fibroblasts

謝 辞

本研究に対し、終始御懇篤なる御指導、御鞭達および本論文の御校閲を賜りました千葉大学薬学部長、広瀬聖雄教授に謹んで感謝致します。

本研究の機会を恵与され、御便宜を賜りました東京都老人総合研究所総合研究部松尾光芳部長に感謝致します。また本研究を進めるに際し御助言を賜りました本研究所生化学部千秋達雄室長、工業技術院微生物工業研究所三井洋司室長に感謝致します。種々の放射線防御剤の入手の御便宜を賜りました京都大学医学部菅原努名誉教授に感謝致します。老人研細胞（TIG）を樹立、管理された本研究所老人研細胞管理委員会、フローサイトメトリーで御協力頂いた本研究所基礎病理学部宇津山正典博士、グルタチオンエチルエステルとOTCの化学合成に際し御助言を賜りました本研究所アイソトープ研究室浦野四朗博士、御協力頂いた同研究室中野俊一郎氏、また培養細胞のマイコプラズマ混在の定期的な検査の御便宜を賜りました同研究室加治和彦博士に感謝致します。

最後に、本研究にあたり御協力頂きました同研究室マーガレット・M・ドウリー博士、松本茂信博士、金子孝夫博士、本研究所写真室藤田喜弘氏および機械工作室五味不二也氏に御礼申し上げます。

文献

- 1) A.P. Chorazak, Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci., 18, 50 (1973)
- 2) H.T. Blumenthal and M. Alex, Gerontologia, 21, 129 (1975)
- 3) H. Maisel, The Ocular Lens, Structure Function and Pathology, Marcel Dekker, New York, (1985)
- 4) S.M. Garn, C.G. Rohmann, P. Wagner, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 26, 1729 (1967)
- 5) W. Andrew, The Anatomy of Aging in Man and Animals, Grune and Stratton, New York and London, (1971)
- 6) H. Tauchi and T. Morikawa, Nagoya Med. J., 2, 1 (1954)
- 7) H. Tauchi, K. Tsuboi and K. Sato, Nagoya Med. J., 4, 71 (1958)
- 8) H. Tauchi, *ibid*, 24, 97 (1961)
- 9) B.L. Strehler, Time, Cells and Aging, Academic Press, New York, (1977)
- 10) B.L. Strehler, D.D. Mark, A.S. Mildvan and M.V. Gee J. Gerontol., 14, 430 (1959)
- 11) H. Brody, J. Comp. Neurol., 102, 511 (1955)
- 12) H. Tauchi, M. Hananouchi and T. Sato, Mech. Ageing Dev., 12, 7 (1980)
- 13) T. Sato and H. Tauchi, Acta Pathol. Jpn., 25, 403 (1975)

- 14) H. Tauchi, T. Sato and H. Kobayashi, *Mech. Ageing Dev.*, 3, 279 (1974)
- 15) R.C. Adelman, G. Stein, G.S. Roth and D. Englander, *ibid*, 1, 49 (1972)
- 16) N.L.R. Bucher and A.D. Glinos, *Cancer Res.*, 10, 324 (1950)
- 17) C.E. McCreight and N.M. Sulkin, *J. Gerontol.*, 14, 440 (1959)
- 18) A.V. Piscotta, D.W. Westring, C. Deprey and B. Walsh, *Nature*, 215, 193 (1967)
- 19) A. Weismann, *Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems*, Oxford Press, Oxford, (1891)
- 20) L. Hayflick and P.S. Moorehead, *Exp. Cell Res.*, 25, 589 (1961)
- 21) L. Hayflick, *Exp. Cell Res.*, 37, 614 (1965)
- 22) L. Hayflick, *Ann. Rev. Geron. Geriat.*, 1, 26 (1980)
- 23) W.W. Nichols, V.J. Cristofalo, L.H. Toji, A.E. Greene, M.M. Anonson and S. Dwight, *In Vitro*, 19, 797 (1983)
- 24) E.L. Bierman, *ibid*, 14, 951 (1978)
- 25) S.C. Thornton, S.N. Muller and E.M. Levine, *Science*, 222, 623 (1983)
- 26) V.P. Collins, *Mech. Ageing Dev.*, 5, 193 (1976)
- 27) N.L. Perillo, R.L. Walford, M.A. Newman and R.B. Effros, *Exp. Gerontol.*, 24, 177 (1989)

- 28) Y. Koshihara, M. Kawamura, H. Oda, S. Higaki,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 145, 651 (1987)
- 29) H. Rink, R. Vornhagen and H.-R. Koch, In Vitro, 16,
15 (1980)
- 30) J.G. Rheinwald and H. Green, Nature, 265, 421 (1977)
- 31) P.J. Hornsby, K.A. Aldern and S.E. Harris, J. Cell.
Phys., 129, 395 (1986)
- 32) S.S. Rattan and J.H. Buchanan, Mech. Ageing Dev.,
19, 1 (1982)
- 33) K. Kontermann and K. Bayreuther, Gerontol., 25,
261 (1979)
- 34) M. Raes and J. Remacle, Exp. Gerontol., 18, 223
(1983)
- 35) D. Pye, A. MacGregor and J.F. Stanley, In Vitro,
13, 232 (1977)
- 36) G.M. Martin, C.A. Sprague and C.J. Epstein, Lab.
Invest., 23, 86 (1970)
- 37) E.L. Schneider and Y. Mitsui, Proc. Nat. Acad. Sci.
USA, 73, 3584 (1976)
- 38) D. Röhme, ibid, 78, 5009 (1981)
- 39) V.J. Cristofalo and B.B. Sharf, Exp. Cell Res., 76,
419 (1973)
- 40) Y. Mitsui and E.L. Schneider, Mech. Ageing Dev., 5,
45 (1976)
- 41) D.W. Deamer and J. Gonzales, Arch. Biochem.

- Biophys., 165, 421 (1974)
- 42) T. Mets, E. Bekaert and G. Verdonk, Mech. Ageing Dev., 22, 71 (1983)
 - 43) L.E. Orgel, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 49, 517 (1963)
 - 44) T.E. Johnson and G. MacCaffrey, Mech. Ageing Dev., 30, 285 (1985)
 - 45) C.B. Harley, J.W. Pollard, J.W. Chamberlain, C.P. Stanners and S. Goldstein, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 1885 (1980)
 - 46) J. Pitha, E. Stork and E. Wimmer, Exp. Cell Res., 94, 310 (1975)
 - 47) J.M. Ryan, G. Duda and V.J. Cristofalo, J. Gerontol. 29, 616 (1974)
 - 48) K.V.A. Thompson and R. Holliday, Exp. Cell Res., 112, 281 (1978)
 - 49) G.J. Kantor, J.R. Mulkie and D.R. Hull, *ibid*, 113, 283 (1978)
 - 50) R.S. Gupta, J. Cell. Physiol., 103, 209 (1980)
 - 51) D. Harman, J. Gerontol., 11, 298 (1956)
 - 52) J.F. Turnes and A. Boveris, Biochem. J., 191, 421 1980
 - 53) J.F. Turnes, A. Alexander and A.L. Lehninger, Arch. Biochem. Biophys., 237, 408 1985
 - 54) G.M. Bartoli, T. Galeotti, G. Palombini, G. Parisi

- and A. Azzi, Arch. Biochem Biophys., 184, 276 (1977)
- 55) J.M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 243, 5753 (1968)
- 56) J.F. Turnes, B.A. Freeman, J.G. Levitt and J.D. Crapo, Arch. Biochem. Biophys., 217, 401 (1982)
- 57) N. Oshino, B. Chance, H. Sies and T. Bucher, ibid, 154, 117 (1973)
- 58) V. Massey, S. Strickland, S.G. Mayhew, L.G. Howell, P.C.Engel, R.G. Matthews, M. Schuman and P.A. Sullivan, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 891 (1969)
- 59) J.M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6049 (1969)
- 60) D.A. Rowley and B. Halliwell, Arch. Biochem. Biophys., 225, 279 (1983)
- 61) D. Kessel, Cancer Res., 41, 1318 (1981)
- 62) K.J.A. Davies, M.E. Delsignore and S.W. Lin, J. Biol Chem. 262, 9902 (1987)
- 63) P.L. Keeling, L.L. Smith and W.N. Aldridge, Biochim. Biophys. Acta, 716, 249 (1982)
- 64) H. Kasai and S. Nishimura, Gann, 75, 565 (1984)
- 65) K. Brawn and I. Fridovich, Arch. Biochem. Biophys., 206, 414 (1981)
- 66) W.A. Pryor, Free Radicals in Biology, 1, 1 (1976)
- 67) L. Flöhe, ibid, 5, 223 (1982)

- 68) D. Ross, I. Cotgreave and P. Móldeus, *Biochim. Biophys. Acta*, 841, 278 (1985)
- 69) N. Suttorp, W. Toepfer and L.Roke, *Am. J. Physiol.*, 251, C671 (1986)
- 70) C.S. Foote and R.W.Denny, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6233 (1968)
- 71) B.M. Tolbert, *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 27, 121 (1985)
- 72) A.L. Tappel, *Vitam. Horm.*, 20, 493 (1962)
- 73) B. Demple, J. Halbrook and S. Linn, *J. Bacteriol.*, 153, 1079 (1983)
- 74) B. Chance, H. Sies and A. Boveris, *Physiol. Rev.*, 59, 527 (1979)
- 75) J.D. Balentine, *Pathology of Oxygen Toxicity*, Acad. Press, (1982)
- 76) A. Patz, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 66, 940 (1968)
- 77) J.L. Smith, *J. Physiol.*, 24, 19 (1899)
- 78) A.R. Behnke, S.J. Fenimore, J.R.Poppen and E.P. Motley, *Am. J. Physiol.*, 110, 565 (1935)
- 79) S.S. Schcket, J. Esterson, B. Bradfod, M. Michaelis and R.D. Richards, *Israel J. Med. Soc.*, 8, 1596 (1972)
- 80) E.M. Gregory and I. Fridovich, *J. Bacteriol.*, 114, 1193 (1973)
- 81) J. Crapo and D. Tierney, *Am. J. Physiol.*, 226, 1401

- (1974)
- 82) T. Bilinski, Z. Krawiec and A. Liczmanski and J. Litwinska, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 533 (1985)
- 83) H. Nohl and D. Hegner, *Eur. J. Biochem.*, 82, 563 (1978)
- 84) C. Richter, J.-W. Park and B.N. Ames, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 6465 (1988)
- 85) K. Kihara, S. Ishida and H. Okumura, *J. Biol. Stand.* 9, 243 (1981)
- 86) R.E. Heikkila and F. Cabbat, *Anal. Biochem.*, 75, 356 (1976)
- 87) P.J. Hissin and R. Hilf, *ibid*, 74, 214 (1976)
- 88) K. Nishiki, D. Jamieson, N. Oshino and B. Chance, *Biochem. J.*, 160, 343 (1976)
- 89) R.M. Drew, R.B. Painter and L.E. Feinendegen, *Exp. Cell Res*, 36, 297 (1964)
- 90) I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 1 (1986)
- 91) J.A. Fee, *Trends in Biochem. Sci.*, 7, 84 (1982)
- 92) B. Halliwell, *ibid*, 7, 270 (1982)
- 93) B. Halliwell and J.M. Gutteridge, *Arch. Biochem. Biophys.*, 262, 501 (1986)
- 94) A. Meister and M.E. Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 711 (1983)

- 95) R. Cox and W.K. Masson, *Int. J. Radiat. Biol.*, 26, 193 (1974)
- 96) S. Goldstein, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 730 (1971)
- 97) O.M. Pereira, J.R. Smith and L. Packer, *Photochem. Photobiol.*, 24, 237 (1976)
- 98) P. Bowman and C.W. Daniel, *In Vitro*, 8, 434 (1973)
- 99) N. Yamanaka and D.W. Deamer, *Physiol. Chem. Phys.*, 6, 95 (1974)
- 100) A.S. Sun, B.B. Aggarwal and L. Packer, *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 1 (1975)
- 101) A.A. Fryer, R. Hume and R.C. Strange, *Biochim. Biophys. Acta*, 883, 448 (1986)
- 102) M. Poot, A. Verkert and J.F. Jongkind, *Mech. Ageing Dev.*, 27, 315 (1984)
- 103) R. Parshad and K.K. Sanford, *Nature*, 268, 736 (1977)
- 104) S. Ban, O. Nikaido and T. Sugahara, *Radiat. Res.*, 81, 120 1980
- 105) A. Macieira-Coelho, C. Diatloff, C. Billardon, C.A. Bourgeois and E. Malaise, *Exp. Cell Res.*, 104, 215 (1977)
- 106) R. Gerschman, D.L. Gilbert, S.W. Nye, P. Dwyer and W.O. Fenn, *Science*, 119, 623 (1954)
- 107) D.A. Rowley and B. Halliwell, *FEBS Lett.*, 138, 33

(1982)

- 108) H.E. Walburg, *Adv. Radiat. Biol.*, 5, 145 (1975)
- 109) E. Saksela and P.S. Moorehead, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 50, 390 (1963)
- 110) A.D. Conger and L.M. Fairchild, *ibid*, 38, 289 (1952)
- 111) A.L. Tappel, *Free Radicals in Biology*, 5, 1 (1980)
- 112) R.A. Phillips and L.J. Tolmach, *Radiat. Res.*, 29, 413 (1966)
- 113) R.R. Weichselbaum, J. Nove and J.B. Little, *Nature*, 271, 261 (1978)
- 114) G.M. Hahn, *Radiat. Res.*, 64, 533 (1975)
- 115) E.-M. Park and J.A. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta*, 964, 151 (1988)
- 116) K. Nakashima, S. Pontremoli and B.L. Horecker, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 64, 947 (1969)
- 117) F. Mirabelli, A. Salis, V. Marinoni, G. Finardi, G. Bellomo, H. Thor and S. Orrenius, *Arch. Biochem. Biophys.*, 264, 261 (1988)
- 118) H. Sies and K.-H. Summer, *Eur. J. Biochem.*, 57, 503 (1975)
- 119) A. Meister, *Science*, 220, 472 (1983)
- 120) B. Boettcher and A. Meister, *Anal. Biochem.*, 138, 449 (1984)
- 121) M.E. Anderson, F. Powrie, R.N. Puri and A. Meister,

- Arch. Biochem. Biophys., 239, 538 (1985)
- 122) A. Russo and J.B. Mitchell, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10, 1243 (1984)
- 123) T. Ishii, I. Hishinuma, S. Bannai and Y. Sugita, J. Cell. Physiol., 107, 283 (1981)
- 124) M.-F. Tsan, E.H. Danis, P.J.D. Vencchio and C.L. Rosano, Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 270 (1985)
- 125) F. Goethals, G. Krack, D. Deboyser and M. Roberfroid, Toxicicol., 26, 47 (1983)
- 126) D. Ho and W.E. Fahl, J. Biol. Chem., 259, 11231 (1984)
- 127) R.D. Issels, A. Nagel, K.-G. Echat and W. Wilnanns, Biochem. Pharmacol., 37, 881 (1988)
- 128) U. Bertsche and H. Schorn, Radiat. Res., 105, 351 (1986)
- 129) S.R. Rittling, K.M. Brooks, V.J. Cristofalo and R. Baserga, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83, 3316 (1986)
- 130) A. Holmgren, Curr. Topics in Cell. Regul., 19, 47 (1981)
- 131) H. Ohara and T. Terashima, Exp. Cell Res., 58, 182, (1969)
- 132) S. Honda, T. Senshu and M. Matsuo, Cell Biol. Int. Rep., 5, 553 (1981)

- 133) C. McCay and M. Crowell, J. Nutrit., 10, 63 (1935)
- 134) R.K. Liu and R.L. Walford, J. Gerontol., 30, 129
(1975)
- 135) R.S. Sohal and H. Donato, Exp. Gerontol., 13, 335
(1978)
- 136) G.A. Sacher, In: The Biology of Aging, (C.E. Finch
and L. Hayflick, eds) pp.582-638 Van Nostrand
Reinhold, New York, (1977)
- 137) J.M. Tolmasoff, T. Ono and R.G. Cutler, Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 77, 2777 (1980)
- 138) J.M. MacCord, New Eng. J. Med., 312, 159 (1985)
- 139) M.B. Spina and G. Coher, Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
86, 1398 (1989)
- 140) H.I. Calvin, C. Medvedovsky and B.V. Worgul,
Science, 233, 553 (1986)
- 141) J. Mårtensson, R. Steinberg, A. Jain and A. Meister,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86, 8727 (1989)