

放射線照射後のラットにおける酸化反応物測定値と皮膚障害の関係

金子 崇, 後藤 準, 野宮琢磨*, 根本建二*

山形大学医学部医学科

*山形大学医学部放射線腫瘍学

(平成22年12月1日受理)

要 旨

【背景】近年は身体における活性酸素やフリーラジカルによる酸化物質の蓄積を簡便に計測することが可能になり、この酸化ストレス値が喫煙・高血圧・糖尿病などにおいて高値を示すことが報告されている。がん治療において放射線は日常的に用いられているが、正常な皮膚にも脱毛・痂皮・潰瘍といった副作用を生じる。放射線照射はフリーラジカルを生成することが知られており、酸化物質・酸化ストレス値の増加があると予想される。しかし現時点では酸化ストレス値を計測して放射線障害との関連性を示した研究は報告されていない。今回我々は異なる線量の放射線を照射したラットで皮膚障害モデルを作成し酸化ストレス値を計測して、皮膚障害の発生と酸化ストレス値との関係性を調べた。

【方法】実験動物としてWistar系統、6～7週齢、メスのラットを用いた。これを対照群、30Gy照射群、50Gy照射群、70Gy照射群の4群に分け、各線量をラット右大腿部皮膚に一回で照射した。放射線照射前、3日後、7日後、16日後、24日後、31日後、38日後にd-ROMsテストによって血中の酸化物質濃度を酸化ストレス値として測定した。又、放射線照射前、3日後、7日後、16日後、21日後、24日後、27日後、31日後、34日後、38日後の皮膚の状態を観察し障害の程度を重症度のグレードに応じて評価した。

【結果】非照射群を除く何れの線量群も放射線照射後16日目に皮膚障害が出現し始め、線量に相関して障害のグレードも有意に高かった。酸化ストレス値も照射後16日目にピークが出現し、高線量群が低線量群より有意に高値を示した。皮膚障害出現期間と酸化ストレス高値の期間はよく一致し、密接に関連することが示唆された。

【結論】哺乳動物の放射線による障害が今回の計測法により早期に感知できる可能性が示唆された。今後は放射線治療患者における障害の評価やラジカル除去治療などへの応用が期待される。

キーワード : フリーラジカル、酸化ストレス、放射線、ラット、皮膚障害

1 緒 言

放射線はがん治療において日常的に用いられているが、がん細胞に細胞死をもたらす機序は細胞のDNAを傷害することにより正常な分裂を妨げ、細胞壊死やアポトーシスを誘発することによる¹⁾。

放射線により致死障害を受けた細胞はその線量や放射線感受性により異なる形態の細胞死を呈することが知られている。照射後に細胞分裂を待たずに細胞死に至る細胞間期死 (interphase death)、照射後も数回細胞分裂を繰り返した後に細胞死に至る分裂死 (mitotic death)、細胞死の形態も細胞が自身のDNAを分断し能動的に誘導されるアポトーシス (apoptotic death) や対照的に細胞の恒常的な生命活動を維持できずに死に至る細胞壊死 (necrotic death) などが挙げられる²⁾⁻⁷⁾。

広義の放射線の中で物質を電離する作用 (細胞を傷害する作用) を持つものを電離放射線 (ionizing radiation) と呼ぶが、電離放射線がDNAを傷害する機序としては、放射線の電離作用によってDNAが直接的に切断される直接作用 (direct effect) と、放射線が水分子を電離することにより生じるフリーラジカルやその代謝物によって間接的に近傍のDNAが切断される間接作用 (indirect effect) の2通りに分けられる¹⁾。

放射線の間接作用として生じるフリーラジカルは、 H^+ 、 $OH\cdot$ (ヒドロキシルラジカル)、 e_{aq}^- (水和電子)、 H_2O_2 、 $H\cdot$ (水素ラジカル) などがあり、二次的に $HO_2\cdot$ (ヒドロペルオキシラジカル) や O_2^- (スーパーオキシド) を生じる⁸⁾。放射線を含む種々のストレスにより誘導されたこれらのフリーラジカルはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの抗酸化酵素により水と酸素に分解される⁹⁾。

先に述べた放射線によるもの以外にも、ATP

の産生または消費、好中球やマクロファージによる異物消化や分解などからもフリーラジカルは発生する。このほか喫煙、高血圧、高脂血症、慢性閉塞性肺疾患などの疾患においてもフリーラジカルによる酸化反応物の値が高値を示すことが報告されている¹⁰⁾⁻¹³⁾。

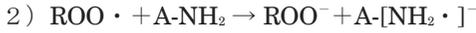
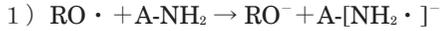
このような電離放射線の間接作用によってフリーラジカルが生じ細胞を傷害することにより、照射部位において脱毛、痂皮、潰瘍といった皮膚障害がみられることが知られている。臨床の放射線治療に於いても部位によっては治療中の発赤・水疱・浮腫といった急性期放射線皮膚炎が高頻度に見られることは知られている¹⁴⁾。さらに、日常診療で見える機会は殆どないが一定の耐容線量を越えると皮膚潰瘍や皮膚壊死といった晩期も稀に起こることが報告されている¹⁵⁾。しかし、電離放射線照射後の生体における酸化代謝物を計測することによる経時変化とそれによる晩期皮膚障害との関係性を調べた研究は今のところ報告されていない。今回我々は照射後の哺乳動物における酸化ストレスの経時変化と晩期皮膚障害との関係性について解析を行った。

2 対象と方法

フリーラジカル計測法: フリーラジカルや活性酸素は生体内の他の物質との反応性が高く、その寿命は短い。そのため、フリーラジカルとの反応で生じる酸化反応物ROM (Reactive Oxygen Metabolites) を計測することでフリーラジカル・活性酸素種を間接的に計測するd-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites) テストを用いた^{16), 17)}。

フリーラジカルによる酸化反応物の一つであるヒドロキシルペルオキシド (ROOH) は血中など鉄が存在する環境においてアルコキシラジカル ($RO\cdot$) やペルオキシラジカル ($ROO\cdot$) を生じる。これらの反応はフェントン反応 (Fenton Reaction) の一種とされる¹⁸⁾。この2

種類の代謝物は特定の試薬(N,N-diethyl-para-phenyldiamine : A-NH₂)と下記の様な反応を呈する。



上の式のように、フリーラジカル・活性酸素と反応して産生されるアルコキシラジカルもペルオキシラジカルも試薬と反応してA-[NH₂・]⁻を生じる。この反応物であるA-[NH₂・]⁻はピンク色を呈する物質であり、505nmあるいは546nmの波長を吸収する。よって、採取したラットの血液を特定の試薬と混合した上で一定の波長の光の吸光度を計測することによりその吸収曲線より間接的に発生したフリーラジカル・活性酸素種を定量することが可能になる。計測された酸化代謝物 (ROMs) の量は Carratelli単位 (CARR U) で表記され、数値が高いほど発生ラジカル・酸化ストレスが多いという指標になる。

実験動物：今回の実験では実験動物として Wistar 系統、6～7 週齢、メスのラットを用いて実験を行った。なお、この実験は山形大学動物実験規程を厳守した上で行った。

放射線照射および採血方法：処置を行う際はラットをジエチルエーテルにて吸入麻酔した後、9% 抱水クロラル 0.5ml を腹腔内投与し、麻酔下に処置を行った。

麻酔下のラットをアクリル板に固定し、右大腿部の皮膚にのみ放射線を照射した。対照群 (0Gy) は麻酔・固定は行ったが照射はしなかった。放射線は 4 MeV (メガ電子ボルト) の電子線を用い、足関節は 2 mm 鉛板にて遮蔽した。ラットは計測する群を対照群 (0Gy) と 3 つの照射群に分け、30Gy/1 回照射群、50Gy/1 回照射群、70Gy/1 回照射群とし、それぞれ 1 群当たり 5 匹のラットを用いた。30Gy-70Gy の各線量は過去のマウス皮膚に対する照射実験に基づき、皮膚障害に一定の差が生ずる線量として設定された¹⁹⁾。

酸化ストレス値の測定は放射線照射前、3 日

後、7 日後、16 日後、24 日後、31 日後、38 日後に麻酔下のラットの尾静脈から 50 μl (マイクロリットル) の血液を採取し、d-ROMs テストを行った。

晩期皮膚障害の観察は放射線照射前、3 日後、7 日後、16 日後、21 日後、24 日後、27 日後、31 日後、34 日後、38 日後に観察し、分類表に基づいて各ラットの皮膚障害の経時的変化を記録した。皮膚障害は Ando K らによるグレード分類表に基づいて分類した¹⁹⁾。皮膚障害グレードを要約すると次のようになり、数値が大きいほど重度の障害を表す；グレード 0：変化がない状態、1：わずかな発赤、2：重篤な発赤・わずかな乾燥落屑、3：明確な乾燥落屑・わずかな湿潤落屑、4：重篤な乾燥落屑・明確な湿潤落屑、5：重篤な湿潤落屑 (乾燥・湿潤とは落屑の際に表皮が乾燥しているか湿潤しているかを表す)。乾燥落屑か湿潤落屑かの判定は視診・触診により判定を行った。落屑の程度は照射面積の 1/3 未満の変化を“わずかな”変化と定義し、照射面積の 1/3 以上・2/3 未満の変化を“明確な”変化と定義し、照射面積の 2/3 以上の変化を“重篤な”変化と定義づけられ、これらの判定規準や用語は Ando K らのグレード分類表に準じて定義されている¹⁹⁾。酸化反応物の値と同様に経時的に観察した。

統計学的解析：皮膚障害は各群の皮膚障害グレードの平均を対応のある時系列データとして repeated-measure ANOVA (analysis of variance) を用いて各群間の有意差検定を行った。酸化反応物の値も同様に repeated-measure ANOVA を用いて解析した。

3 結 果

各群ラットに対する放射線照射後の皮膚障害の変化と時間の変化を図 1 に示す。皮膚障害の各群の [照射前/Day3/Day7/Day16/Day24/Day31/Day38] の平均グレードは、30Gy 群で [0/0/0/0.8/1.0/1.4/1.4/1.5/1.2/1]、50Gy 群で [0/0/0/1.1/

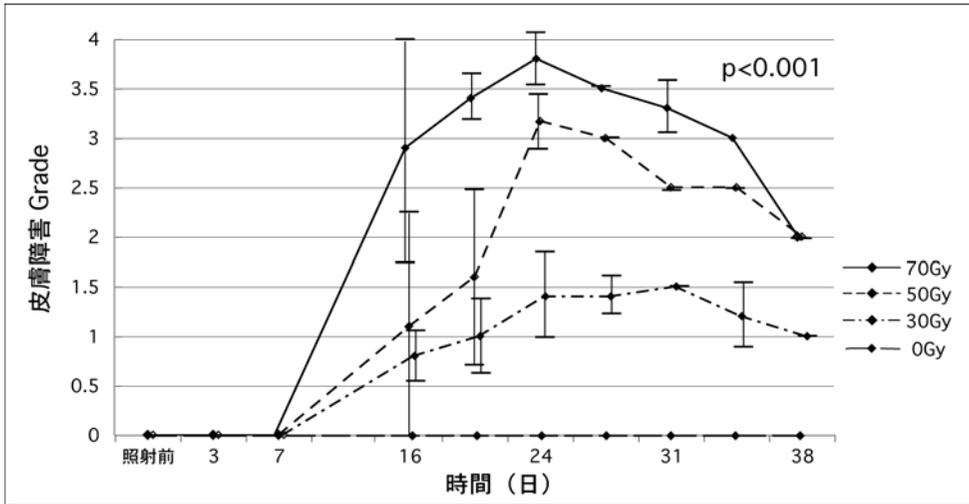


図1. 30Gy照射群、50Gy照射群、70Gy照射群、0Gy群の皮膚障害度の変化

1.6/3.2/3.0/2.5/2.5/2.0]、70Gy群で[0/0/0/2.9/3.4/3.8/3.5/3.3/3.0/2.0]であった。0Gy群は非照射のため当然ながら皮膚障害は全く出現していない。障害グレードは放射線照射量に応じて70Gy群、50Gy群、30Gy群の順により重度の皮膚障害が発生する傾向が見られ、群間に有意差が見られた ($p < 0.001$)。どの群でも放射線照射後16日目から障害が出現し始め、24-31日目にかけて皮膚障害のピークが見られた。

次に各群のラットに対する放射線照射後の酸化反応物の測定値と時間の変化を図2に示す。各時点[照射前/Day3/Day7/Day16/Day24/Day31/Day38]での平均測定値は0Gy群で[299.2/412/368.4/373.4/347.6/364.8/340]、30Gy群で[271/443/365.6/433.6/374.2/391.6/377.6]、50Gy群で[371.4/498.6/452/530/497.7/468.7/395.5]、70Gy群は[313.4/498.6/426/548.4/484.2/455/387]であった。酸化反応物の測定値の全体の変化としては、30Gy群と50Gy群/70Gy群の間には有意差がみられた ($p = 0.029$)。50Gy群と70Gy群の差は明確ではないが照射線量が多いほど酸化反応物の測定値も高い傾向がみられた。どの群でも皮膚障害の出ている照射後

3日目に酸化反応物の一過性の上昇が見られ、16日目に再度酸化反応物の測定値のピークがありそれ以降は徐々に低下する傾向が見られた。酸化反応物の測定値の二度目の上昇～低下まで期間は、皮膚障害の出現～障害の改善の時期とほぼ一致していた。

4 考 察

1) 照射線量と皮膚反応

Moulderらはラット皮膚にX線を照射し、線量が大きくなると共に皮膚障害が強くなることを示している。皮膚障害のピーク出現は照射時より20-30日後に見られることが示されている²⁰⁾。γ線や粒子線を用いたラット皮膚での照射実験でも同様に線量が大きくなるにつれ強い皮膚反応が出ることが示されている¹⁹⁾。Gorodetskyらは照射による皮膚障害を張力の点から検討した。照射線量が大いほど皮膚張力が低下することが示され、組織を支持する膠原線維や結合組織が酸化物質によって損傷を受けていることが示唆される²¹⁾。

今回の我々の実験結果において皮膚障害のグ

照射後のラットにおける酸化反応物の値と皮膚障害

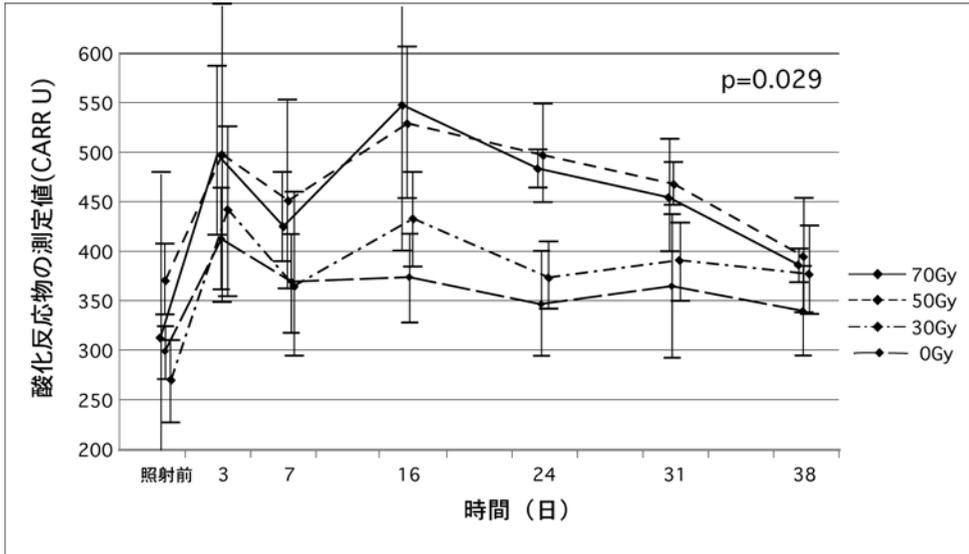


図2. 30Gy照射群、50Gy照射群、70Gy照射群、0Gy群の酸化反応物の測定値の変化

レードは70Gy/50Gy/30Gyの順に照射線量が多いほど強い皮膚障害が発生しており、予想に矛盾せず照射線量と障害の重症度は相関するといえる。どの群も皮膚障害は照射後7日目以降から出現し始め、徐々に増加し21日目から31日目に皮膚障害のピークがみられた。照射後31日目以降はどの群も障害のピークを過ぎ回復していく傾向が見られた。これら照射後の経過はMoulderら、Andoらによる過去の実験結果とよく一致していた¹⁹⁾。

2) 酸化反応物の値の初期反応

フェントン反応を利用した酸化ストレスの数値化はAlbertiらによって報告されている。糖尿病における末梢循環障害や血圧、慢性C型肝炎など身体的ストレス環境に於いて血液の酸化ストレス値が疾患の重症度と相関することが示されている^{22)–24)}。しかしながら、放射線による皮膚障害をd-ROMテストによる酸化反応物の値によって評価した研究は今のところ報告されていない。

今回の実験結果では酸化反応物の値のグラフは各群ともに3日目に一過性のピーク形成が見

られた。この一過性のピークに関しては二つの原因が考えられる。一つは放射線照射に起因する酸化反応物の上昇であり、もう一つは放射線照射と直接関連しないラットの身体的・精神的ストレスによる酸化ストレス環境下での値の上昇である。

放射線照射に起因する酸化反応物測定値上昇機序の一つとして細胞内代謝活性の上昇が考えられる。放射線被曝した細胞内ではp53等細胞周期に広く関与する遺伝子や、NF-κBなどの転写因子合成や蛋白質の合成が活性化することが知られている^{25), 26)}。これらの代謝活性化はATPの産生・消費を促進し、活性酸素の増加が酸化反応物の増加につながっていると考えられる。また、細胞膜脂質の酸化も初期酸化反応物測定値上昇の一因と考えられる。放射線は脂肪酸を酸化することによって脂肪酸ラジカル(R·)、ペルオキシラジカル(ROO·)を生ずる。このペルオキシラジカルはさらに新たな脂肪酸ラジカル(R·)が生成するという連鎖的脂質過酸化反応も亜急性期の酸化反応物測定値増加の一因と考えられる²⁷⁾。放射線に起因しな

い理由としては、照射ではなく吸入麻酔や腹腔内への麻酔薬注射、アクリル板への固定など実験処置そのものが実験動物へのストレスとなっている可能性は十分考えられる。別に行った急性期の酸化反応物測定値の解析でも、本解析と同様に麻酔・固定のみで放射線を照射していない対照群が照射群ほどではないが3日目に酸化反応物測定値の上昇が見られており、放射線以外の身体的侵襲も初期のストレス増加に関与していると考えられる²⁸⁾。本解析では対照群と50Gy群・70Gy群では酸化反応物測定値の全体的な変化に有意な差が見られ ($p < 0.05$)、これは共通の処置によるストレス以外に放射線照射や皮膚障害を反映していると推測される。但し対照群と30Gy群では差がある傾向がみられたものの、有意ではなかった ($p = 0.11$)。

3) 酸化反応物測定値上昇と皮膚反応

7日目以降は16日目にかけて再び酸化反応物測定値の上昇がみられる。着目すべき点としては酸化反応物測定値のグラフと皮膚障害度のグラフを比較すると、酸化反応物測定値の二つ目のピークと皮膚障害が発生する時期がほぼ一致していることが挙げられる。酸化ストレス値の二つ目のピーク出現から高値持続期間は皮膚障害の出現期間と概ね一致する。グラフから見る限りこれら酸化反応物測定値上昇と皮膚障害出現には密接な関係があることが示唆される。

組織に放射線が照射されると直接的あるいは間接的に生じた電子やラジカルによってDNA損傷が起こり、致命的な損傷を受けた細胞は壊死あるいはアポトーシスにより細胞死に至る¹⁾。しかし細胞死に至るのは照射直後ではなく、他の照射実験や当研究の実験結果からも示されている通り照射から3週間程度経過してからである^{19)–21)}。

ラットの腸管を用いた照射実験では照射後48時間で腸上皮の形態変化が見られ、72時間で潰瘍形成が見られている²⁹⁾。これに対して表皮の場合は基底層から新たに扁平上皮細胞が分化する組織のターンオーバーに約2週間ほどかか

り、機能的にも主に支持組織であり内分泌機能や消化吸収機能を果たしていないために障害の顕性化に時間がかかると考えられる^{30), 31)}。

細胞死はその形態から壊死(ネクローシス)とアポトーシスに大別できるが、放射線照射により致命的傷害を受けたヒト固形癌や正常組織ではその殆どが壊死であり、アポトーシスの割合は低いとされている^{32)–36)}。

ネクローシスあるいはアポトーシスを起こした細胞はサイトカイン・ケモカインなどを周囲に放出し組織の炎症を引き起こす³⁷⁾。これによる組織の損傷や免疫系・修復機構の活性化も酸化物質の増加・測定値の上昇につながると考えられる。またマクロファージが壊死した組織片や異物を貪食する際には、スーパーオキシドを産生するNADPHオキシダーゼやNOラジカルを産生するiNOSなどが合成される³⁷⁾。このような貪食反応もフリーラジカル増加を介して酸化反応物増加の原因となりうる。

そのほか、細胞死の際には細胞を構成している脂質の過酸化が起こることが知られている³⁸⁾。この脂質の過酸化が細胞死の原因であるのか細胞死の結果であるのかは議論の中にあつた。しかし最近の幾つかの報告によって、細胞はグルタチオン(GSH)のような抗酸化物質を絶えず産生することで自身を酸化物質から能動的に防護していることが示された^{39), 40)}。細胞死によって細胞の抗酸化活動は停止し、脂質の過酸化を妨げている防御機構が失われることで過酸化脂質が増加するという機序が有力である。このように壊死細胞に見られる脂質過酸化反応で生じた脂肪酸ラジカル(R·)やペルオキシラジカル(ROO·)も酸化ストレス値を上昇させる直接的原因の一つと考えられる。

当実験での皮膚障害の経過に見られるように皮膚障害はピークに達した後は回復に転じる。皮膚の回復期は致命的DNA損傷を受けた細胞はほぼ死滅し、基底層から新たに分化した細胞による皮膚の再生(リモデリング)が起こっていると考えられる。この時期は壊死細胞も減少

するため炎症・ラジカル発生・過酸化物質の産生が減少し、酸化反応物の測定値も皮膚回復に伴い減少していくと推測される。

これらの理由が放射線による皮膚障害によって酸化反応物の値が上昇する機序と考えられた。今回の実験ではラットにより哺乳動物に対する放射線反応を酸化反応物の計測によって数値化できる可能性が示された。今後は遺伝子・蛋白レベルでの細胞内代謝変化を検証する事が一つの課題と考えられる。同様に放射線治療中のヒトにおいて照射による皮膚粘膜反応と血液酸化ストレス値が相関すると急性期の放射線障害を予測するうえで有用であるかもしれない。また近年ではフリーラジカルを除去するエダラボンなどの薬剤が医療に応用されており、これらが照射によるフリーラジカル発生や障害を予防する効果が動物実験にて示されれば放射線治療中の患者にも応用できる可能性が期待できる。

結論：放射線皮膚障害ラットを用いて放射線性皮膚障害と酸化反応物測定値の関連性を検討した。皮膚障害の程度と酸化反応物の値は相関する傾向が見られた。また、皮膚障害出現時期と酸化反応物測定値のピークは一致していた。哺乳動物に於いて放射線による皮膚障害で酸化反応物の値が相関することが初めて示された。

今後は放射線治療中のヒトにおける酸化反応物測定値の臨床的検証と、酸化ストレスに対する防護薬剤の有効性に関する動物実験等の検証が必要と考えられる。

謝 辞

本研究は科学研究費補助金〔若手(B)20790876〕の助成を受けたものである。

参考文献

1. Perez CA: The Discipline of Radiation

Oncology. In: Perez CA, Brady LW, Halperin EC and Schmidt-Ullrich R. Principles and Practice of Radiation Oncology (4th edition). Philadelphia, PA; Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 9-10

2. Thompson LH, Suit HD: Proliferation kinetics of x-irradiated mouse L cells studied WITH TIME-lapse photography. II. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1969; 15(4): 347-362
3. Tolmach LJ: Growth patterns in x-irradiated HeLa cells. *Ann N Y Acad Sci* 1961; 95: 743-757
4. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE: Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33(4): 781-796
5. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-257
6. Milas L, Stephens LC, Meyn RE: Relation of apoptosis to cancer therapy. *In Vivo* 1994; 8(5): 665-673
7. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM: Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-245
8. Hutchinson F: Chemical Changes Induced in DNA by Ionizing Radiation, In: Cohn, Waldo E. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology)* <32>. Florida, Academic Press, Inc., 1985: 117-118
9. de Abreu FC, Ferraz PA, and Goulart MO: Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. *J Braz Chem Soc* 2002; 13(1): 19-35
10. Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi K, Hayashi T: High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res* 2007; 631(1): 55-61
11. Incandela L, Belcaro G, Cesarone MR, De Sanctis MT, Griffin M, Cacchio M, et al.:

- Oxygen-free radical decrease in hypertensive patients treated with lercanidipine. *Int Angiol* 2001; 20(2): 136-140
12. Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R: An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008; 41(14-15): 1162-1167
 13. Markoulis N, Gourgoulianis KI, Moulas A, Gerogianni E, Molyvdas AP: Reactive oxygen metabolites as an index of chronic obstructive pulmonary disease severity. *Panminerva Med* 2006; 48(4): 209-213
 14. Potera ME, Lookingbill DP, Stryker JA: Prophylaxis of radiation dermatitis with a topical cortisone cream. *Radiology* 1982; 143(3): 775-777
 15. Thomas F, Ozanne F, Mamelle G, Wibault P, Eschwege F: Radiotherapy alone for oropharyngeal carcinomas: the role of fraction size (2 Gy vs 2.5 Gy) on local control and early and late complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15(5): 1097-1102
 16. Pasquini A, Luchetti E, Marchetti V, Cardini G, Iorio EL: Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. *Vet Res Commun* 2008; 32(2): 137-143
 17. Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Carratelli M: The radical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res Chem Intermed* 2000; 26(3): 253-267
 18. Stadtman ER, Berlett BS: Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* 1991; 266(26): 17201-17211
 19. Ando K, Koike S, Nojima K, Chen YJ, Ohira C, Ando S, et al.: Mouse skin reactions following fractionated irradiation with carbon ions. *Int J Radiat Biol* 1998; 74(1): 129-138
 20. Moulder JE, Fischer JJ, Casey A: Dose-time relationships for skin reactions and structural damage in rat feet exposed to 250-kVp x rays. *Radiology* 1975; 115(2): 465-470
 21. Gorodetsky R, Mou XD, Fisher DR, Taylor JM, Withers HR: Radiation effect in mouse skin: dose fractionation and wound healing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18(5): 1077-1078
 22. Ricci A, Ruffini I, Cesarone MR, Cornelli U, Corsi M, Belcaro G, et al.: Variations in plasma free radicals with topical aescin + essential phospholipids gel in venous hypertension: new clinical data. *Angiology* 2004; 55 Suppl 1: S11-14
 23. Ruffini I, Belcaro G, Cesarone MR, Geroulakos G, Di Renzo A, Milani M, et al.: Evaluation of the local effects of vitamin E (E-Mousse) on free radicals in diabetic microangiopathy: a randomized, controlled trial. *Angiology* 2003; 54(4): 415-421
 24. Morisco F, Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Marmo R, De Luise G, et al.: Oxidative status in chronic hepatitis C: the influence of antiviral therapy and prognostic value of serum hydroperoxide assay. *Free Radic Res* 2004; 38(6): 573-580
 25. Martinez JD, Pennington ME, Craven MT, Warters RL, Cress AE: Free radicals generated by ionizing radiation signal nuclear translocation of p53. *Cell Growth Differ* 1997; 8(9): 941-949
 26. Lyng H, Landsverk KS, Kristiansen E, DeAngelis PM, Ree AH, Myklebost O, et al.: Response of malignant B lymphocytes to ionizing radiation: gene expression and genotype. *Int J Cancer* 2005; 115(6): 935-942
 27. Hogg N, Kalyanaraman B: Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 378-384
 28. 金子崇, 後藤準, 野宮琢磨, 根本建二: 放射線照射後のラットにおける酸化ストレス値の経時変化. 山形大学紀要(自然科学) 2011; 第17巻第2号(印刷中)

29. Wiernik G, Shorter RG, Creamer B: The arrest of intestinal epithelial 'turnover' by the use of x-irradiation. *Gut* 1962; 3: 26-31
30. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 Suppl 1: 11830-11835
31. Withers HR: Recovery and repopulation in vivo by mouse skin epithelial cells during fractionated irradiation. *Radiat Res* 1967; 32(2): 227-239
32. Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Nakatani H, et al.: Overexpression of bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis. *Int J Cancer* 1996; 67(1): 101-105
33. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, Milas L, Meyn RE: Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res* 1991; 127(3): 308-316
34. Rodel C, Haas J, Groth A, Grabenbauer GG, Sauer R, Rodel F: Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55(5): 1341-1347
35. Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 1997; 14(23): 2759-2766
36. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kroncke KD: Necrosis is the predominant type of islet cell death during development of insulin-dependent diabetes mellitus in BB rats. *Lab Invest* 2003; 83(4): 549-559
37. Cinel I, Opal SM: Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 2009; 37(1): 291-304
38. Eklow-Lastbom L, Rossi L, Thor H, Orrenius S: Effects of oxidative stress caused by hyperoxia and diquat. A study in isolated hepatocytes. *Free Radic Res Commun* 1986; 2: 57-68
39. Starke PE, Farber JL: Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Biol Chem* 1985; 260: 10099-10104
40. Fawthrop DJ, Boobis AR, Davies DS: Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol* 1991; 65(6): 437-444

Relationship between measurements of blood oxidative metabolites and skin reaction in irradiated rats

Takashi Kaneko, Jun Goto, Takuma Nomiya, Kenji Nemoto

Yamagata University Faculty of Medicine

**Department of Radiation Oncology, Yamagata University Hospital*

ABSTRACT

Recently, oxidative metabolites have been able to be measured by simple small device. It has been reported that the value of oxidative metabolites increases under several conditions such as hypertension, smoking, diabetes mellitus, etc. Radiation used in radiotherapy also causes free radicals and oxidative metabolites, and irradiation causes dermatitis and sometimes causes skin ulcer in the irradiated site. We analyzed the relationships between the value of oxidative metabolites and skin reactions.

A certain doses of radiation were irradiated to the right thigh of rats, and oxidative metabolites of rat's blood from caudal vein were measured by d-ROMs test using an exclusive device. Skin reactions were evaluated according to a skin-reaction grading system from the day before irradiation to day 38 after irradiation.

As a results, a significant correlation was shown between irradiation dose and skin grade. And a significant correlation was also shown between the value of oxidative metabolites and irradiation dose. The increase in oxidative metabolites was seen in the Day 16 after irradiation, and that corresponded with the appearance of skin reaction. It was suggested that the value of oxidative metabolites seems to be useful for estimating degree of skin reaction and time to appear skin reaction after irradiation.

Key words : free radical, oxidative stress, radiation, rat, skin reaction