

解説

## ストレスのない世界はない-細胞ストレス生物学入門-その 2

大塚健三

中部大学応用生物学部細胞ストレス生物学教室

### 1-5 温熱の細胞致死効果

前回では、動物の培養細胞を用いたコロニー形成法による細胞死の測定方法を解説しました[1]. この方法は、細胞が増殖能をもち、コロニー(増殖して形成された細胞集団)を形成することのできる細胞を生きるとみなし、そうでない細胞を死んでいると判断します. 温熱というストレスにさらされると細胞は死んで(増殖能を失って)しまう、ということになります. この項では、温熱のさまざまな実験条件における細胞死のようすを見ていきたいと思ひます.

温熱による細胞死の研究は、もともとがんの治療を目指したものなので、用いる細胞はヒトを含む哺乳類の培養細胞であり、温度も正常の培養条件は 37°C、加温の温度はおおむね 40~45°Cです. 加温するときには、細胞を培養したシャーレを水が漏れないようにシールして、一定温度の恒温水槽に沈めます. 40~45°C温度範囲でしばらく加温したあと、恒温槽からシャーレを取り出して、シールをはがし、ふたたび 37°Cで培養して1週間から10日ほどしてから、コロニー数を計測し、生存率を求めます. この方法では、加温というインプットと、増殖能を維持している細胞の数というアウトプットを見ていることになり、加温により細胞の中で何が起きているのか、というメカニズムはわかりません. この細胞死のメカニズムについても紹介します.

#### 1-5-1 加温の温度が高いほど、また加温の時間が長いほど細胞はよく死ぬ

温度が高くなると細胞は死んでしまう、ということは自明の理であります. 一番わかりやすいのが、タマゴを高温でゆでると卵白や卵黄のタンパク質が変性していわゆる「ゆで卵」になってしまうことではないでしょ

うか. お湯の温度が高いほど、また加温時間が長いほどしっかりとしたゆで卵ができあがります. ゆで卵からはひよこは生まれてきません. つまり、ゆで卵は死んでいることになります.

図1を見て下さい. ここでは縦軸はコロニー形成法で測定した生存率、横軸は加温時間です[2]. 図の中には41.5°Cから45°Cまでの温度での生存率のグラフが描かれています. 細胞はチャイニーズハムスター由来の細胞株です. まず気がつくことは、温度が高いほど細胞は速く(短時間の加温で)死んでしまうことです. それから、同じ温度でも加温時間が長くなるとより多くの細胞が死にます. もう一つ特徴的なことは、42.5°C以下の温度では、生存率の線の傾きが途中から折れ曲り、平坦に近くなっていることです. つまり細胞がそれ以上長く加温しても死にくくなっているのです. これは、細胞がその温度での加温中に温熱に

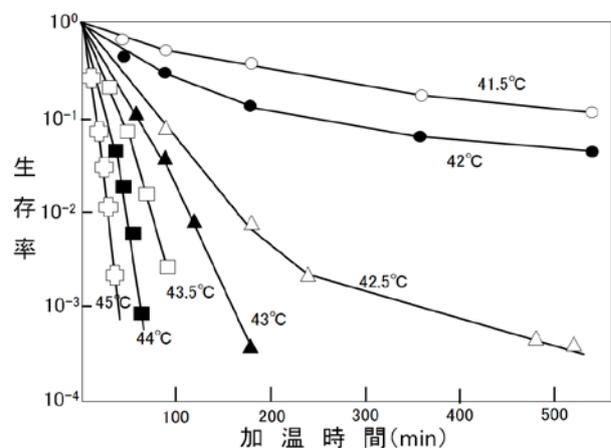


図 1

温熱の細胞致死効果. チャイニーズハムスターの細胞(CHO)を各温度で一定時間加温したのち、コロニー形成法により生存率を求めた. 43°C以上ではほぼ直線的に生存率が低下するが、42.5°C以下では途中で折れ曲がり、平坦に近くなる. 縦軸は対数目盛(文献2から改変).

耐性になったことを示しています。この温熱耐性については、項を改めて紹介します。

### 1-5-2 生存率曲線の反応速度論的解析（アレニウスプロット）

この項は少し難しい内容なので飛ばして読んでも結構です。図1の縦軸の生存率は対数で表しています。このような場合、加温時間の増加とともに生存率が指数関数的に減少していく、といいます。そして、各温度での生存率曲線は、はじめに若干の肩の部分があり、その後ほぼ直線的に減少していきます。そして温度によって細胞死の速度に違いがあります。生存率は時間の関数なので、化学反応の速度論的解析が可能になります。その際に使われるのがアレニウスプロット\*1で、その化学反応（ここでは細胞死）の活性化エネルギー\*2を求めることができます。

まず、各温度での生存率曲線の直線部分の傾きから、生存率が  $1/e$  ( $e$  は自然対数の底で、 $2.7182\dots$ 、つまり、 $1/e$  は約  $0.37$ ) に減少するのに要する加温時間（これを  $D_0$  と表し、その温度での平均細胞致死時

間となる)を求めます。つぎに縦軸に  $D_0$  の逆数 ( $1/D_0$ ) をとり、横軸は絶対温度\*3 ( $T$ ) の逆数 ( $1/T$ ) をとってグラフを描きます。それが図2に示したアレニウスプロットです。横軸は絶対温度の逆数ですが、図の上には対応する摂氏温度も表記しています。また横軸の数値は左側が大きく右側が小さくなっています。この図には2種類の細胞の生存率曲線から得られたデータ、および、同じ細胞でも別の研究者の結果もまとめられています[3]。特徴的なことは、 $43^\circ\text{C}$ 前後を境としてグラフが折れ曲がっていることです。このグラフの傾きからこの反応（ここでは熱による細胞死）の活性化エネルギーを求めると、一般的に、 $43^\circ\text{C}$ 以上では  $130\sim 180\text{ kcal/mol}$ 、それ以下では  $300\sim 500\text{ kcal/mol}$ 、と計算されます。 $43^\circ\text{C}$ 前後で活性化エネルギーに違いがあるというのは、熱による細胞死のメカニズムが  $43^\circ\text{C}$ の上と下で異なることを意味します。 $43^\circ\text{C}$ 以上の温度での活性化エネルギーの値は、別の研究からわかっている多くの酵素活性の失活やタンパク質の変性の活性化エネルギーと近い値を示すことから、細胞内代謝にとって重要な酵素やタンパク質の変性や失活が細胞死の原因であると示唆されています。 $43^\circ\text{C}$ 以下での細胞死はこれとは別のメカニズムによると考えられています。あとで述べるこの温度領域でのアポトーシス細胞死と、この活性化エネルギーとの関連はまだよくわかりません。

図2のアレニウスプロットからもう一つわかることは、温度を  $1^\circ\text{C}$  上昇すると、 $43^\circ\text{C}$ 以下では約  $1/4$  の加温時間、 $43^\circ\text{C}$ 以上では約  $1/2$  の加温時間で、同じ細胞致死効果が得られることです。たとえば図1で、 $1/100$  ( $10^{-2}$ ) の生存率になるのに、 $43^\circ\text{C}$ では約  $120$  分、 $44^\circ\text{C}$ では約  $60$  分となっています。

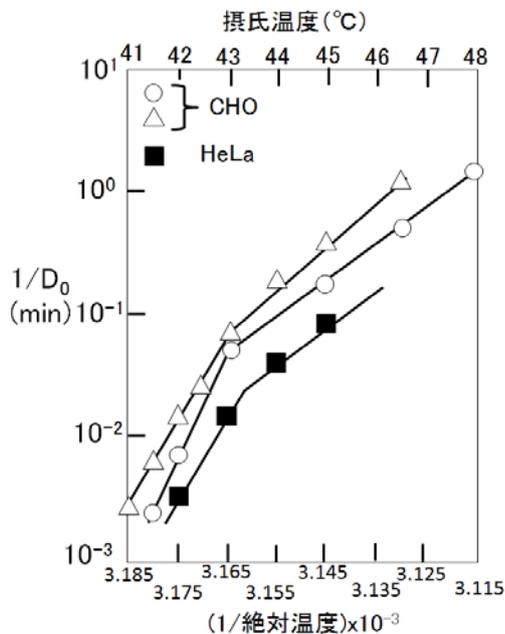


図2 温熱による細胞死のアレニウスプロット。2種類の細胞のデータをプロットしてある。各温度での生存率曲線の直線部分から平均細胞致死時間(D0)の逆数の対数を、絶対温度(K)の逆数に対してプロットした。 $43^\circ\text{C}$ 前後で折れ曲がっているのがわかる(文献3から改変)。

\*1アレニウスプロット: 化学反応(本文中では細胞致死反応)の速度は温度によって変化し、温度が高いほど速く進行する。温度を変化させて化学反応速度を測定し、その化学反応の活性化エネルギーを求めるときにこの方法を用いる。

\*2 活性化エネルギー: 化学反応が起こるときには一時的にエネルギーの高い状態(遷移状態)を経て進行する。この遷移状態になるまでに必要なエネルギーを活性化エネルギーとい

い、反応が進行する際の障壁と考えることができる。温度が高くなると分子運動が盛んになるので化学反応は速くなる。

\*<sup>3</sup> 絶対温度: 摂氏-273°Cが絶対温度では 0 K である。摂氏 0°Cは 273 Kとなる。絶対零度(0 K)ではすべての分子の運動エネルギーがゼロとなる。

### 1-5-3 温熱感受性を修飾する要因-細胞周期やpHなど

細胞の温熱感受性(熱に弱いのか強いのか)を示すのに、図1で示した生存率曲線の勾配( $D_0$ )の値が一般的に用いられています。つまり、ある温度で加温した場合、 $D_0$  が大きい(勾配がゆるやかな)細胞は感受性が低く(熱に強く)、その逆の(勾配が急で  $D_0$  が小さい)場合は感受性が高い(熱に弱い)ことを表します。細胞の温熱感受性は、細胞自身のもつ性質(細胞周期、細胞の種類)や、細胞の環境要因(pH や栄養条件)によっても変化します。この項では、特に細胞周期と pH の変化に対する温熱感受性について述べます。

細胞周期とは、1 個の細胞が分裂して 2 個の細胞になるとき、細胞の中では DNA 複製をはじめとしてさまざまな反応が起きており、その一連の過程のことをいいます。2 個になった細胞がまた分裂して 4 個の細胞になるときにも同様の反応が起きているので(細胞)周期(cycle)といえます。便宜的に、分裂直後の状態を  $G_1$  期、つぎの DNA 複製している時期を S 期(DNA synthesis の意味)、つぎが  $G_2$  期、最後は DNA が染色体という構造体に凝縮(パッキング)されて 2 つの細胞に分かれていく時期を M 期(mitosis, 有糸分裂期)と呼んでいます。

図1で示したデータは、個々の細胞の細胞周期はそろっておらず、バラバラな細胞周期の細胞集団について調べたものです。ところが、細胞周期がそろった状態(同調培養\*<sup>4</sup> により、特定の細胞周期の細胞を集めることができる)で加温して細胞生存率を計測すると、図3のように、S 期から  $G_2$  期にかけてもっとも温熱感受性が高く(細胞が死にやすく)、ついで M 期が、そして  $G_1$  期は温熱に低感受性であることがわかりました[4]。S 期が温熱に感受性なのは、DNA 複製

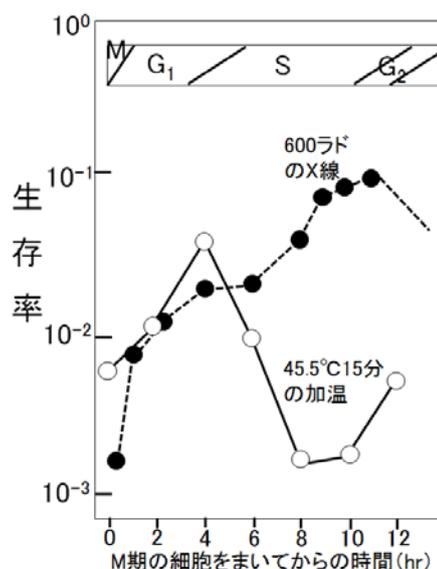


図3

温熱感受性の細胞周期依存性. 分裂期(M期)のCHO細胞を集めてシャーレにまき、一定時間後に45°C15分加温し、生存率を求めた(○). また、X線(600ラド)を照射したときの生存率も求めている(●). S期から $G_2$ 期にかけては、温熱には弱い放射線には抵抗性であることを示している(文献4から改変).

のときはDNAポリメラーゼをはじめとして多くのタンパク質が活発に働いており、それらが熱に感受性なので熱によって不活性化し、DNA複製がうまくいかず細胞が分裂できなくなって死にやすいのではないかと考えられています。

図3には、放射線に対する各細胞周期の感受性のデータも示されていますが、S期から $G_2$ 期にかけては、温熱感受性とはまったく逆で、放射線に抵抗性に(死にくく)なっています。がんの治療という観点からみると、がん細胞は活発に分裂しているのでS期の細胞の割合が高くなっており、放射線には比較的抵抗性ですが温熱には感受性になっています。したがって、放射線と温熱を併用するとS期の多いがん細胞を効率的に殺すことができることとなります。言い換えると、温熱は細胞の放射線感受性を増感させることができる、ということもできます。

次に細胞の環境要因として、pH、栄養条件および酸素分圧などの温熱感受性に対する影響をみてみましょう。細胞外液のpHをpH7.0以下の弱酸性にす

ると、細胞は極端に温熱に弱くなることが知られています(図4) [5]. この図では42°Cの温度で加温していますので、正常な条件である pH7.4 では加温途中に生存率曲線が折れ曲がって温熱耐性の状態になります(図1).ところが、pHをわずかに下げてpH6.7にすると温熱感受性が増加するとともに、加温中の温熱耐性も発現しなくなってしまいます. このことは後でも述べるように、固形腫瘍の内部は一般的に弱酸性になっているので、温熱によるがん治療が効果的であることの理論的根拠にもなっています.

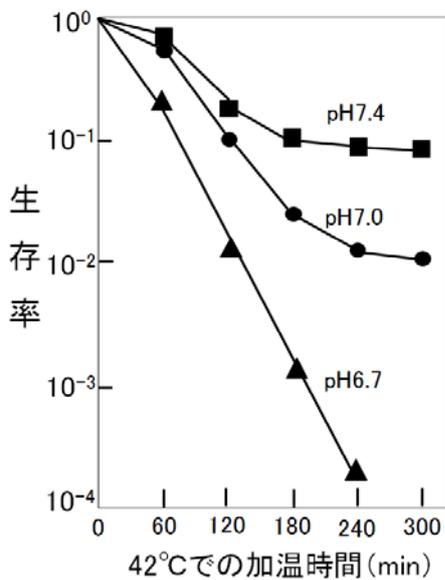


図4 温熱感受性の pH 依存性. CHO 細胞を各 pH の培養液中で 42°C 加温し生存率を求めた. 細胞は pH7.0 以下の弱酸性では極端に温熱に弱くなる. また、42°C 持続加温中に発現してくる温熱耐性も低 pH では発現しない(文献 5 より改変).

一方、放射線に対する感受性はこの程度の pH の変化では変わらないことがわかっています. また、グルコースやアミノ酸などの栄養が不十分な条件下でも温熱感受性が高くなることが報告されています. なお、酸素分圧については低酸素になっても温熱感受性にはあまり影響を与えないようです.

放射線感受性と酸素分圧についてみると、低酸素状態では細胞の放射線感受性が大きく低下することが知られています. その理由は、X 線などの放射線

の生体への影響において、放射線は細胞内外の酸素と反応して酸素ラジカルが発生し、それが細胞の生体高分子 (DNA やタンパク質) を損傷させて細胞を死にいたらしめるからです. しかし、一般的に固形腫瘍では血管の発達が悪いので酸素分圧が低く放射線には抵抗性になっています.

\*4 同調培養: 動物細胞はプラスチックシャーレで培養すると、シャーレの底にへばりついた状態で生育している. しかし有糸分裂期 (M 期) になると形が丸くなって剥がれやすくなり、シャーレを軽くゆするだけで剥がれてくる. このような細胞 (M 期) を集めて培養すると細胞集団全体が M 期から周期がスタートすることになる. これが同調培養である. しかし、個々の細胞の周期進行速度に若干の違いがあるので次第に周期はばらばらになってくる.

#### 1-5-4 がん温熱療法は生物学的に理にかなっている (Biology is with us, physics is against us)

以上述べた温熱感受性を修飾する要因と放射線感受性を考慮すると、生体内の固形腫瘍の組織構築は、温熱と放射線による治療が非常に理にかなっていることがわかります. 図5に示すように、一般的に腫瘍組織は血管の新生が貧弱ですが、わずかにある血管の周辺部だけは栄養が豊富で pH も中性で酸素分圧も高く、この部分ではがん細胞が盛んに増殖しています. ところが、血管から 150~200 μm 以上離れた部位は栄養分や酸素が十分に行き届かないので、低栄養、低 pH、低酸素分圧となっています. pH が低くなっているのは、酸素が十分でないので細胞はおもに解糖系によりエネルギー (ATP) を生産しており、乳酸が蓄積しやすくなっているからです\*5. このような腫瘍組織を温熱で処理すると、血管から離れた周辺部は低栄養、低 pH となっており温熱感受性となっているので死にやすく、一方、血管に近い部分は増殖細胞が多く S 期の細胞が多いので、やはり温熱感受性になっています. したがって、腫瘍組織を確実に 43°C 以上に加温できれば腫瘍組織全体で細胞致死効果が得られることとなります.

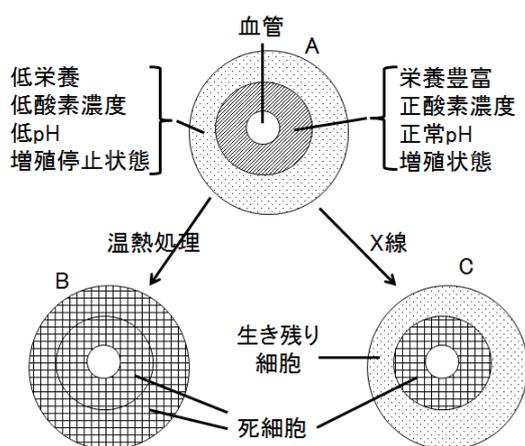


図 5

固形腫瘍の組織構築と環境条件の模式図(A). 固形腫瘍に、温熱処理(B), または X 線照射(C)したときの効果. 温熱処理は腫瘍組織全体で細胞致死効果が期待できる. X 線では生き残る細胞もある. これらを併用することにより、有効な細胞致死効果が得られることがわかる(文献 6 から改変).

また放射線感受性について考えてみると、先にも述べたように腫瘍中の血管から少し離れたところは酸素分圧が低いので放射線には抵抗性です。血管に近い部位では増殖状態にありS期の細胞が多いので放射線抵抗性ですが、酸素分圧が高いため酸素による放射線増感効果によって腫瘍細胞は死にやすくなっています。つまり、温熱と放射線を併用することで腫瘍組織全体で効率よく細胞致死効果が得られることがわかります[6]。

一般的に実験動物の移植腫瘍やヒトの腫瘍で、温熱単独または放射線と併用することによって、正常組織ではそれほどの障害を受けず副作用の程度も少ないのに、顕著な腫瘍抑制効果が得られる場合があります。これは、上に述べた腫瘍組織そのものがもつ性質と環境要因、また血管および血管新生が乏しいため血流による熱の拡散が少なく、加温の物理的条件が同じでも、腫瘍組織の方が正常組織よりも効果的に加温されるためであると考えられています。

このように、生物学的観点からは、温熱によるがん治療がきわめて有効的であることがわかります。しかし実際のヒトのがん治療における臨床の現場では、

腫瘍組織を必要な温度にあげて必要な時間だけ加温する物理工学的な技術が不十分であることがいわれています。このような状況を表して、放射線生物学者のエリック・ホールが 1980 年のがん温熱療法の第 3 回国際会議で、「Biology is with us, physics is against us」と述べています[7]。

\*5 がん細胞での解糖系による ATP 生産: 私たちが食べる栄養分(燃料分子, おもに炭水化物)は、解糖系から、クエン酸回路, 電子伝達系へと経路して徐々に酸化されて最終的に水と二酸化炭素になる。その過程で燃料分子の持つエネルギーは ATP という形に変換される。細胞は ATP の加水分解によるエネルギーを用いてさまざまな生命活動を行っている。これらの代謝過程のうち解糖系は酸素がなくても進行する過程でわずかながら ATP が生成される(グルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP)。クエン酸回路と電子伝達系は酸素が利用できるときに進行する過程で多量の ATP が生成できる(解糖系の 15 倍以上)。腫瘍組織は血管の発達が貧弱なので酸素の供給が十分でなく、ATP の生産をおもに解糖系に依存している。その過程で乳酸が生成されるので腫瘍組織は弱酸性になっている。

### 1-6 温熱による細胞死のメカニズム

前項では、さまざまな条件における温熱の細胞致死効果をみてきました。しかし温熱処理された細胞の中でどのような反応が起こって最終的に細胞が死んでいくのかというメカニズムに不問のままでした。そこで、本項では、40～45℃の温度で加温したときに細胞の中で起こるさまざまな現象や、細胞を構成する高分子(タンパク質や脂質, DNA など)に対する影響などを見ていきます。

40～45℃の温度といっても、42.5℃を境として細胞の反応に違いがあるので、がん温熱療法の観点から、40～42℃の範囲をマイルドハイパーサーミア領域、43～45℃を局所ハイパーサーミア目標温度領域と分けています(図 6)[8]。40～42℃の範囲では、遺伝子発現の変化, 細胞内代謝の変化, 細胞膜の変化, アポトーシスの誘導, 温熱耐性の発現, などがみられます。一方、43～45℃の範囲では、タンパク質の変性、

細胞内小器官の構造変化や機能低下, アポトーシスからネクローシスへの転換などが起こります. 45°C以上の温度では, タンパク質変性をおもな原因とする, まさに「やけど」状態となります. 図7には温熱の生体高分子に対する影響の概略を示しています[9].

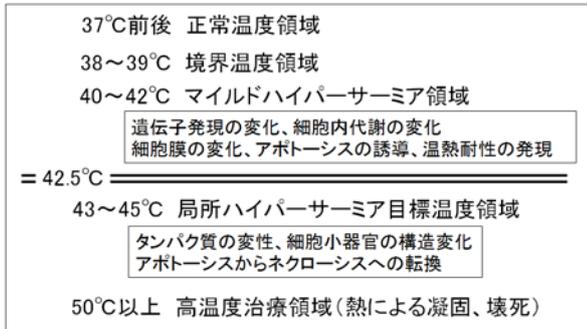


図6 温度領域による生物影響(文献8を参考にした).

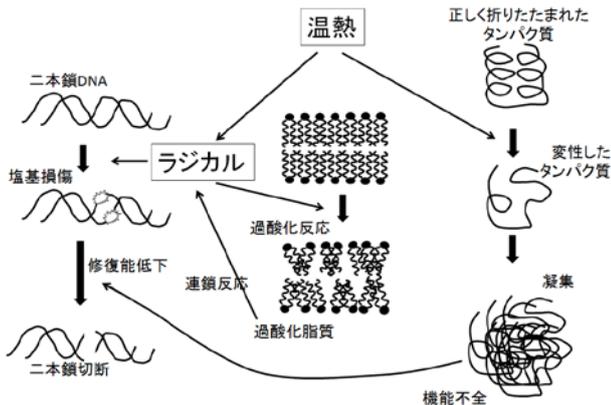


図7 温熱による高分子の損傷のモデル(文献9を参考にした).

### 1-6-1 温熱処理により活性酸素が増加する

細胞は, ミトコンドリアにおいて燃料分子(グルコースや脂肪酸)を酸素(O<sub>2</sub>)によって酸化することで, 燃料分子のもっているエネルギーを ATP という化合物に変換しています. しかしこの過程で不可避免的に非常に反応性の高い活性酸素種\*<sup>6</sup>がわずかながら生成されます. 正常な細胞であれば, スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)によってスーパーオキシドアニオンが, カタラーゼによって過酸化水素が除去されます. また細胞内にある抗酸化物質(アスコルビン酸,

グルタチオン, ビタミン E, 尿酸など)によってもこれらの活性酸素種は消去されます. 40~45°Cの温度それ自身が活性酸素種を発生させることはありません. しかしこの範囲の温度で加温すると, ミトコンドリアの機能が低下し, また SOD やカタラーゼなどの活性酸素種消去系の酵素も失活するので, 細胞内に活性酸素種が増えてきます[10~13]. 実際に加温によって活性酸素種(スーパーオキシドアニオン)が増加することは, 加温の前に抗酸化剤を添加しておくこと活性酸素種の増加が抑制されること[14], 逆に過酸化水素を発生させる試薬を添加すると加温による活性酸素種の増加がさらに促進されることからわかります[15]. 図8に示すように, いったんこれらの活性酸素種が細胞内に増えると, 脂質と反応して過酸化脂質が生成して細胞の膜系が傷害を受けたり, タンパク質の変性を起こしたり, さらに大事な遺伝子である DNA にも損傷を引き起こします. その結果, 以下述べるようなアポトーシス細胞死に至ります[8].

\*<sup>6</sup> 活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS): スーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), 過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ヒドロキシラジカル(・OH)などの分子種のことをいう. 酸素ラジカルなどとも呼ばれる. これらの活性酸素種は非常に反応性が高く, 生体高分子(タンパク質, 脂質, DNA など)に損傷を与え, 細胞機能の低下や細胞死を引き起こす.

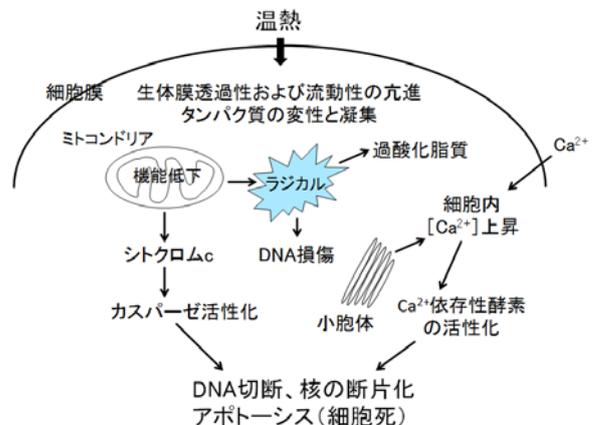


図8 温熱によるアポトーシス誘導のメカニズムのモデル(文献8を参考にした).

### 1-6-2 温熱による脂質の変化

脂質は基本的にはグリセロール分子に脂肪酸が結合したグリセリドやリン脂質、またコレステロールやスフィンゴ脂質などがあり、これらの脂質がタンパク質とともに生体膜の主要な構成成分となっています。生体膜は細胞の内外を区切る細胞膜や、細胞内小器官(ミトコンドリア, ゴルジ体, 小胞体など)を構築する膜系も含まれます。生体膜がしっかり構築されていることで、細胞外からの情報を受け取ったり、細胞小器官もうまく機能することができます。前項で述べたように、温熱によって活性酸素種が増加すると、脂質が酸化されて過酸化脂質が生じ、生体膜の構造が変化し、膜の流動性(柔らかさ)も増加します。また生体膜に含まれるタンパク質の変性も相まって、生体膜の構造がさらに損傷を受けます。そうすると細胞膜や小器官の膜系も正常に機能できなくなります。温熱による生体膜の典型的な損傷の例が、 $\text{Ca}^{2+}$ に対する透過性が変化して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇することです(図 8) [12]。通常、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は約  $10^{-7}$  mol/L と非常に低く保たれています。 $\text{Ca}^{2+}$ は細胞内で情報を伝える因子でもあり、細胞外からの刺激があると必要に応じて小胞体などから  $\text{Ca}^{2+}$ が放出されて一過性に  $10^{-5}$  mol/L 程度に上昇して情報を伝えます。しかしその後速やかに  $\text{Ca}^{2+}$ は小胞体などに取り込まれて元の低い濃度になります。ところが、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ が異常に高い状態が続くと、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の酵素が活性化されることでアポトーシス細胞死などにつながることとなります[8]。

### 1-6-3 温熱によるアポトーシス誘導

細胞が危機的な状況になったときに最終的に死んでしまいますが、その細胞死の様式に大きく分けて 2 種類あります。壊死(necrosis)とプログラム細胞死(programmed cell death)です。壊死とは、細胞が物理的な(たとえば高温)または化学的な(たとえば高濃度の化学物質)処理を受けたとき、機能障害を起こし、最終的に細胞構造の破壊が進行し受動的に死に至る過程のことをいいます。このとき細胞の内容物が放出され生体内ではその部位で炎症反応が引き

起こされます。一方、プログラム細胞死はアポトーシスとも呼ばれています。細胞はもともと、強いストレスを受けて生存が困難になったときに細胞死のプログラムを発動させて自らを死に至らしめる機構を持っています。この機構が発動すると、一連のカパーゼ(caspase)と呼ばれるタンパク質分解酵素が活性化されて細胞内のさまざまなタンパク質が選択的に分解されます。しまいには DNA 分解酵素(caspase-activated DNase, CAD)が活性化されて DNA までもが分解されてしまいます。細胞全体も細切れに断片化してアポトーシス小体(apoptotic body)となります。生体内ではこのアポトーシス小体はマクロファージによって貪食され、細胞の構成成分は完全に分解されます。したがってアポトーシスの過程では細胞の内容物が外に漏れることはないので炎症反応は起こらず、整然とした細胞死が進行することになります。なお、このアポトーシスの過程で、ミトコンドリアの膜構造が変化して中にあるシトクロム c(電子伝達を担うタンパク質の一つ)が放出され、一連のカパーゼが活性化される経路もあります(図 8) [8]。

さて、前項でも述べたように、細胞を加温すると活性酸素種が多くなり、また  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、またミトコンドリアの構造も変化して機能が低下します。これらが引き金となってアポトーシスが引き起こされることとなります。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が活性酸素種を介してアポトーシスを引き起こすことは、活性酸素種を除去する抗酸化剤や、 $\text{Ca}^{2+}$ のキレート剤で細胞を処理しておく、温熱によるアポトーシスが抑制されることから支持されます。一般的に  $42^{\circ}\text{C}$ 前後ではアポトーシスがおもに誘導され、 $43^{\circ}\text{C}$ 以上の温度では壊死が優位に起こることが多く報告されています(図 6)。

### 1-6-4 温熱によるDNAの二本鎖切断

DNA は二本鎖のらせん構造をした直線状のヒモのようなものですが、細胞の核の中ではヒストンというタンパク質複合体に巻きついて存在しています。この DNA に X 線が照射されると DNA 二本鎖が切断されます。このとき細胞ではこの切断を修復する反応が引き起こされます。つまり、この切断箇所に修復に関与

するタンパク質 (Mre11, Rad50, Nbs1) やシグナル関連タンパク質 (Brca1, 53BP1) が集まってくるとともに、ヒストン複合体の構成成分である H2AX というタンパク質がリン酸化されます (これを $\gamma$ H2AX といいます)。切断箇所には近傍の多くの $\gamma$ H2AX が集まって修復に関与するタンパク質と一緒に「フォーカス (focus)」と呼ばれる構造体が形成されます (図 9) [16]。このような細胞を $\gamma$ H2AX に対する特異的な抗体で染色して顕微鏡で観察すると、核の中に小さな多くの「斑点」が見られます。1 個のフォーカスが 1 個の斑点に対応しており、したがって 1 個の斑点が 1 個の二本鎖切断を表していると考えられています。この方法は比較的簡便でしかも感度がいいということで、DNA 二本鎖切断の検出法としてよく利用されています。X 線の場合は DNA 二本鎖切断が細胞死のおもな原因であると考えられています。

40~45°Cの温度では DNA に損傷が起こるようなことはないと考えられていましたが、驚いたことに、DNA 二本鎖切断がこの範囲の温度でも誘導されるということが、奈良県立医科大学の高橋ら (当時) によって報告されました [17]。温熱による細胞死と $\gamma$ H2AX フォーカス形成の時間経過がよく相関しています。また細胞周期の S 期は温熱に感受性であることは述べましたが、 $\gamma$ H2AX フォーカス形成もやはり S 期で多く形成されます。このようなことから彼らは温熱でも DNA 二本鎖切断が誘発され、これが細胞死に

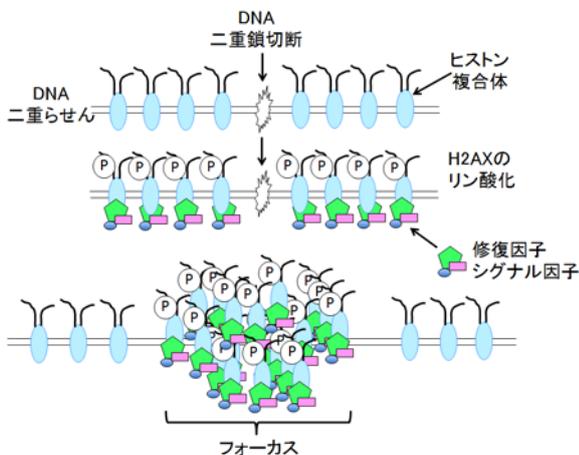


図 9 DNA 二本鎖切断を起因とするフォーカス形成 (文献 16 から改変)。

関連していると示唆しています。しかし、この範囲の温度が直接 DNA の二本鎖を切断することはエネルギー的に考えにくいことです。ただ、先に述べたように加温によって活性酸素種が増加し、これが核酸成分の塩基を酸化したり (チミグリコールや 8-オキシグアニン)、脱アミノ化、塩基の遊離などの損傷を引き起こします。これらの損傷は塩基除去修復という過程で修復されますが、これに関与する酵素の一つである DNA ポリメラーゼ $\beta$ が熱に感受性であることが知られています。この修復の過程で DNA ポリメラーゼ $\beta$ が熱で失活すると DNA 一本鎖切断が残ることになり、DNA 一本鎖切断が隣の DNA 鎖の近傍でも生じると、DNA 二本鎖切断が起こる可能性も考えられます。また DNA 複製過程で DNA 二本鎖がほどけている箇所の近傍で一本鎖切断が残っている場合にも DNA 二本鎖切断が起こると、高橋らは提案しています (図 10) [18]。

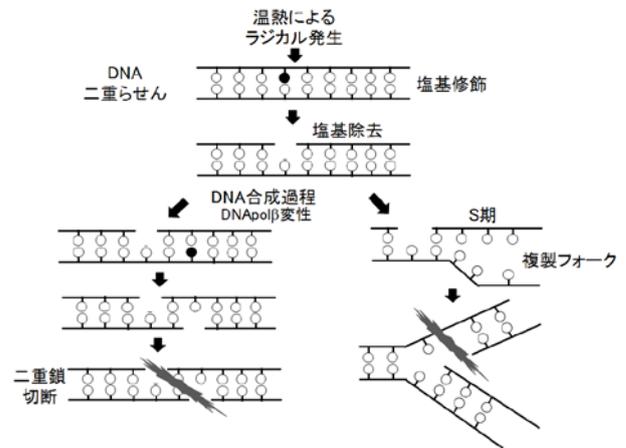


図 10 温熱による DNA 二本鎖切断のメカニズム (仮説) (文献 18 を参考にした)。

### 1-7 温熱耐性, ストレス耐性, 軽いストレスを受けると細胞は強くなる

さてここからは、あらかじめ軽い温熱やストレスにさらされると、その後に少々強いストレスにさらされても抵抗性になり細胞は死にくくなる、という現象を詳しく見ていきます。1-3-2 の項で述べたように、組織レベルなどでの温熱耐性の発現は、定性的な現象として

は知られていましたが、培養細胞を用いて定量的に明確に示したのは、1975年の Gerner と Schneider の論文です[19].

**1-7-1 分割加温による温熱耐性発現**

彼らは、ヒトの子宮頸がん由来の HeLa(ヒーラー)細胞を用いて、最初 44°C で 1 時間加温してから細胞を 37°C で 2 時間培養し、ふたたび 44°C で加温すると、44°C 単独の場合よりも生存率が上昇し、生存率曲線の傾きが約 1/3 に減少することを示しました(図 11). 縦軸の生存率は、もちろんコロニー形成法で計測したものです. この図を見てみると、最初の 44°C 加温で生存率が約 1/10 に低下しています. つまりこの時点で約 9 割の細胞は死んだ(増殖能を失った)ことになります. 生き残った約 1 割の細胞は、37°C の温度で 2 時間培養している間に、次の 44°C の温度に対して抵抗性を獲得したことになります. これが分割加温(温熱による加温を 2 回に分けて行うこと)による温熱耐性の発現と呼んでいます.

それでは、2 時間の 37°C の間に細胞の中では何が起きているのでしょうか? それを確かめるために彼ら

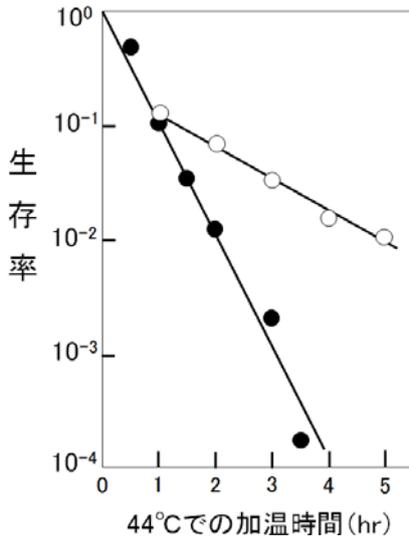


図 11

分割加温による温熱耐性発現. ヒトの HeLa 細胞を 44°C 単独加温(●), または 44°C 1 時間加温したのち 37°C で 2 時間培養し、ふたたび 44°C 加温したとき(○)の生存率. 横軸には 44°C の総加温時間をとってある(文献 19 から改変).

は、2 回の 44°C 加温(1 回目も 2 回目も 44°C 1 時間加温)の間の 37°C での培養時間を 1~5 時間と変化させて生存率を測定してみました. すると、図 12A に示すように、次第に生存率が上昇していくのがわかりました. つまり温熱耐性の程度がゆっくりと時間をかけて大きくなっていくのです. さらに、44°C 1 時間加温のあと、細胞を 0°C に 2 時間置いてから 37°C に移してみたところ、0°C の間は生存率の上昇が見られず、37°C になってから温熱耐性が発現してくるのがわかりました(図 12B). これらの結果をよく考えてみると、最初の 44°C での加温が刺激となって、次の 37°C の間に細胞の中で耐性の発現に必要な何らかの代謝過程 (cellular metabolic activity) が起こっており、その過程は 0°C では進行しない、ということが示唆されます. さらに大事なことは、最初の 44°C 1 時間の加温による効果が 0°C 2 時間では消失していないということです. Gerner と Schneider はこの論文では具体的な代謝過程については言及していません[19]. じつは、この代謝過程こそ熱ショックタンパク質 (heat shock pro-

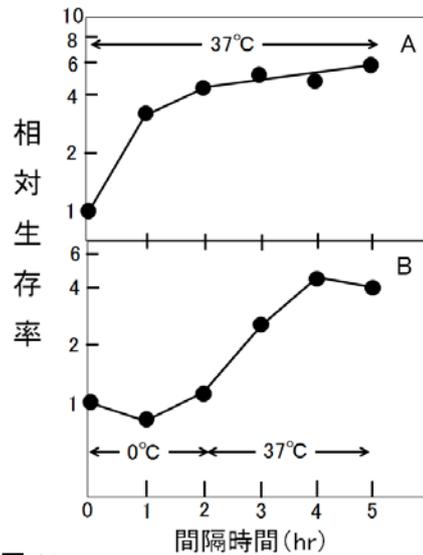


図 12

HeLa 細胞における温熱耐性発現の時間経過. A, 44°C 1 時間間のあと細胞を 37°C にもどし一定時間(1~5 時間)後にふたたび 45°C 1 時間加温した. B, 44°C 1 時間加温後、細胞を 0°C に 2 時間おいてから 37°C にもどし、一定時間後に 44°C 1 時間加温した. 横軸には分割加温の間隔時間. 縦軸には相対生存率をとってある(文献 19 から改変).

teins, ヒートショックプロテイン)の合成であることがわかってきたのです。このことについては、章を改めて述べることにします。

がんの治療という観点からは、正常組織には温熱耐性が発現して熱による細胞死を少なくし(副作用の軽減)、がんの組織には発現しない(温熱による細胞致死効果が大)のであれば都合がいいのですが、そううまくいきません。図 11 と 12 はがん細胞である HeLa 細胞での実験結果を示しています。そして、正常細胞にももちろんがん細胞と同じように温熱耐性が発現します。

### 1-7-2 温熱耐性はどの程度維持するのか？

それでは、温熱耐性は一度誘導されたらずっと維持されるのでしょうか、それとも時間が経つと消えてしまうのでしょうか？つまり、最初の加温のあと、37°Cでの培養時間を長くしていった場合、生存率の増加がいつまで続くのか、ということです。図 13 を見てください。これは細胞を最初 44°Cで 30 分加温しています。生存率は約 0.25 になっています。そのまま 44°Cで加

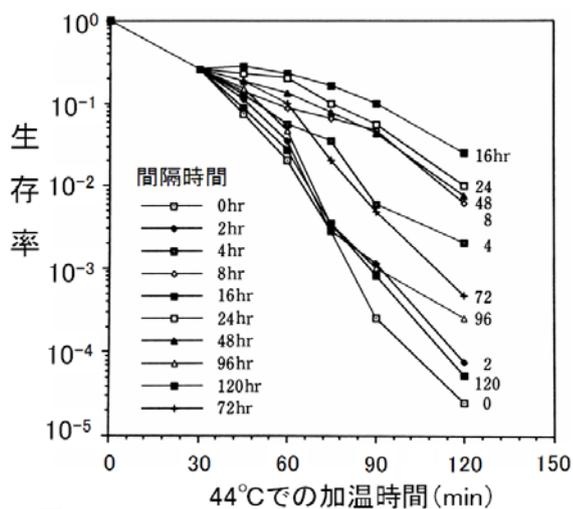


図 13

分割加温による温熱耐性の誘導と減衰。マウスの細胞 (SCCVII) を 44°C 30 分加温したのち、37°C にもどして 2~120 時間の間隔をおいてふたたび 44°C で加温したときの生存率。間隔時間が 8~48 時間では、生存率曲線の勾配が顕著にゆるくなっており、一過性の温熱耐性が発現したことを示している(文献 20 から改変)。

温を続けるとさらに生存率は低下していきます(□)。しかし 44°C で 30 分加温のあと、37°C での培養時間を変えてふたたび 45°C で加温したときの生存率をみると、2 時間以降徐々に生存率曲線が上方にシフトするとともに傾きがゆるくなり、温熱耐性になっていることがわかります。37°C での培養が 16~48 時間のときにもっとも温熱耐性が発現しています。ところが 72 時間(3 日間)のあとでは温熱耐性の程度がだいぶ低下しています(+). さらに 120 時間(5 日間)もすると、ほぼもとの温熱感受性になっています(■)。このことは温熱耐性が一時的な現象であり、数日経過すると消失することを意味しています[20]。

前の項で述べたように温熱耐性は、正常な細胞だけでなくがん細胞でも同様に発現するので、当初、がんの温熱療法にとっては不都合なのではないかと考えられていました。しかし、温熱耐性は一過性の現象であり、3~4 日もするとほとんど消失してしまうので、実際の臨床では週に 1~2 回程度(2 回の場合は 3~4 日の間隔がある)の温熱療法の実施が推奨されるようになりました。

### 1-7-3 その他の加温様式による温熱耐性の発現

さまざまな加温条件での細胞の生存率を調べていくなかで、温熱耐性の発現が、前の項で述べた分割加温だけでなく、他の加温条件でも誘導されることがわかってきました。まず、1-5-1 で述べたように、42.5°C 以下の温度での加温の場合、その温度で長時間加温していると、加温中に生存率曲線が平坦に近くなり、それ以上細胞が死なないようにしています(図 1)。これが持続加温中の温熱耐性発現です。この条件では細胞を 37°C にもどす必要はありません。次に、最初 42°C で 1~2 時間加温してそのあとすぐに 45°C の温度で加温した場合も、45°C 単独の加温に比べて生存率が上昇し、耐性が発現します。このときには 42°C 加温のあと細胞を 37°C に戻す必要はありません。これをステップアップ (step-up) 加温 (42°C → 45°C) による温熱耐性の発現といいます。この場合には、42°C の加温中に耐性発現に必要な代謝過程(じつは熱ショックタンパク質の合成)が起こっています。

41～42℃の温度というのは、細胞にとっては好ましい温度ではありませんが、しかし細胞内の多くの代謝過程(タンパク質合成など)はある程度は阻害されつつも何とか進行しており、生き残っている細胞は加温中に耐性を獲得していると考えられます。41～42℃での持続加温中にタンパク質合成能が回復また維持されることは、1-7-5の項で詳しく述べます。

一方、43℃以上の温度での加温では細胞内のほとんどの代謝過程がほぼ完全に停止してしまうので、加温中には温熱耐性は発現することなく、生存率は時間とともに減少していくことになります。したがって、分割加温のように、最初43℃以上の温度で加温した場合には、そのあと細胞を一度37℃(じつは許容温度の40℃以下であればよい)に戻してしばらく培養しておく必要があるのです。つまり、43℃以上の強いストレスの場合には37℃でしばらく「ひと休み」して、その間に細胞機能が回復して温熱耐性が発現することになります。繰り返しになりますが、この37℃での一休みの間に耐性発現に必要な代謝過程(熱ショックタンパク質の合成)が起こることになります。

以上述べてきた、分割加温、持続加温、またステップアップ加温による温熱耐性発現および減衰のモデ

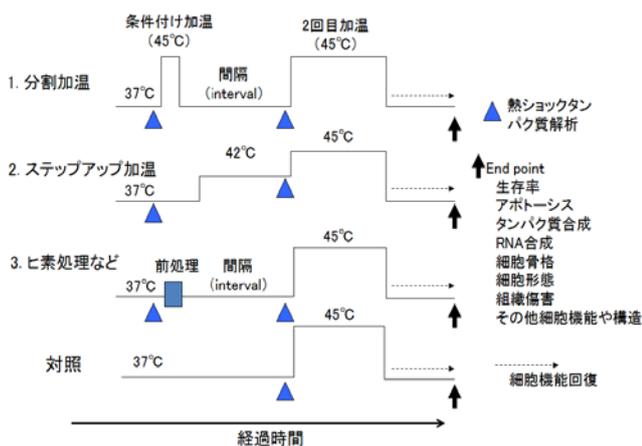


図 14

異なる初期ストレス(あらかじめの処理)による温熱耐性誘導方法。2回目の加温のあと、細胞を37℃で培養し、end pointとして生存率のほかにもさまざまな細胞機能や構造などを調べる。熱ショックタンパク質の検出は初期ストレスの前、および2回目の加温の直前に行う(▲)。

ルとして実験操作的に分けられる3つの過程を考えるとわかりやすいと提案されています[21]。つまり、最初の条件付け加温(conditioning heating)による「ひきがね(trigger)」過程、2番目は発現(development)過程で、分割加温の場合はこの過程で細胞を許容温度(40℃)以下に置く必要があります。3番目は減衰(decay)過程です。43℃以下の持続加温およびステップアップ加温では「ひきがね」および「発現」過程が同時に起こると考えます。このモデルは実験操作的には都合がよく、熱ショックタンパク質の合成・減衰との関連でよく用いられていました。なお、条件付け加温は、あらかじめの加温、とか予備加温、などとも呼ぶことがあります。図14に温熱耐性発現の実験条件などをまとめてあります。

#### 1-7-4 温熱耐性は熱以外の処理でも誘導される、ストレス耐性

ここまでは、温熱というストレスによって温熱に対して抵抗性(温熱耐性)になることを述べてきました。それでは、条件付け加温を全く別のストレスに置き換えても温熱耐性は誘導されるのでしょうか？それがなんと誘導されるのです。温熱以外のストレスで温熱耐性を誘導すると最初に報告されたのはヒ素およびエタノールです[22]。細胞を6%のエタノール(これはビールのアルコール濃度とほぼ等しい)で処理したのち、新しい培養液に交換して培養すると約1時間後には温熱耐性になるそうです。エタノールによる温熱耐性の発現は、分割加温のそれとよく似たような時間経過をとるようです。もしかしたら、お酒をよくたしなむ人の口腔や食道、胃などの上皮細胞は温熱耐性になっているかもしれません。

その後、低酸素処理(hypoxia)、重金属(ヒ素やカドミウム)、プロスタグランジン、局所麻酔剤(リドカインやプロカイン)、グルタチオンを酸化するダイアミド、タンパク質合成阻害剤であるピュロマイシン、などさまざまな前処理で温熱耐性が誘導されることがわかってきました。これらの前処理によって、程度の差はあるけれども熱ショックタンパク質が誘導されることから、やはり温熱耐性と熱ショックタンパク質は関係がある

と示唆されるようになりました。

このようにさまざまなストレスで温熱耐性が発現することから、「ストレス耐性」とも呼ばれるようになりました。なお、温熱耐性(ストレス耐性)という現象はこれまで調べられた全ての生物で観察される普遍的な現象なので、進化的に保存されていることになり、生物にとって非常に重要な機構ということになります。

図 15 には、分割加温、ステップアップ加温、およびヒ素処理による温熱耐性発現のようすが示されています[23]。

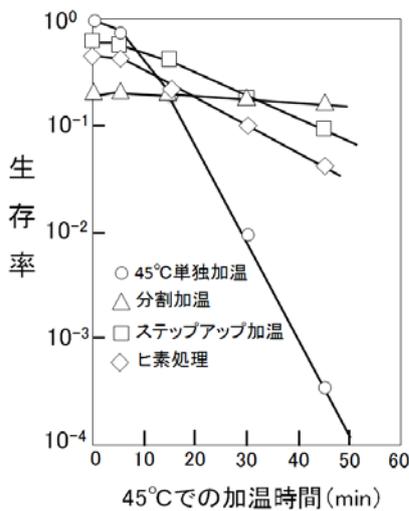


図 15

異なる初期ストレスによる温熱耐性の発現。ラットの細胞(NRK)を用いた。45°C単独加温(○), 分割加温(△, 45°C15分→37°C16時間→45°C加温), ステップアップ加温(□, 42°C2時間→45°C加温), ヒ素処理(◇, 100 mMヒ素1時間→37°C16時間→45°C加温), (文献 23 から改変)。

### 1-7-5 さまざまなタイプの温熱耐性, 強いストレスでも弱く感じる

前の項までは、コロニー形成能を指標にした温熱耐性について見てきました。しかし、40~45°Cの温熱処理によって細胞のさまざまな機能や構造が損傷を受けます。これらの損傷が、細胞をあらかじめ弱い温熱処理(条件付け加温)しておくことで軽減されることがわかってきました。

まずは、細胞機能の一つとしてタンパク質合成能について見てみましょう。細胞のなかではその時点で

細胞にとって必要なタンパク質は、DNA から転写された mRNA の情報をもとにリボソームというタンパク質合成装置で絶えず新しく合成されています。タンパク質合成の測定には、メチオニンというアミノ酸を使います。これはタンパク質合成のさいに最初に取り込まれるアミノ酸がメチオニンだからです。メチオニンはイオウ原子(元素記号は S, 原子量は 32)を持っていますが、これを放射性同位元素(原子量 35 のイオウ原子, [<sup>35</sup>S]と表記)に置き換えたメチオニン([<sup>35</sup>S]メチオニン)を培養液に添加します。一定時間の培養後に細胞を回収し、タンパク質に取り込まれた放射性のメチオニンを測定します。図 16A に示すように、細胞を 45°C15 分処理すると、その直後のタンパク質合成能はもとの 10%以下にまで低下しています(0 時間)。そのあと 37°Cで培養するとその能力は次第に回復してきて、24 時間後にはほぼもとの状態に戻っています。このとき、最初の 45°C15 分の加温のあと、37°Cでしばらくおいてから 2 回目の加温(45°C15 分)を行うと、タンパク質合成能はあまり低下せず抵抗性になっています(図 16B)。8 時間後では 80%程度までしか低下していません。このことは、1 回目の加温が刺激となって、タンパク質合成能が 2 回目の加温

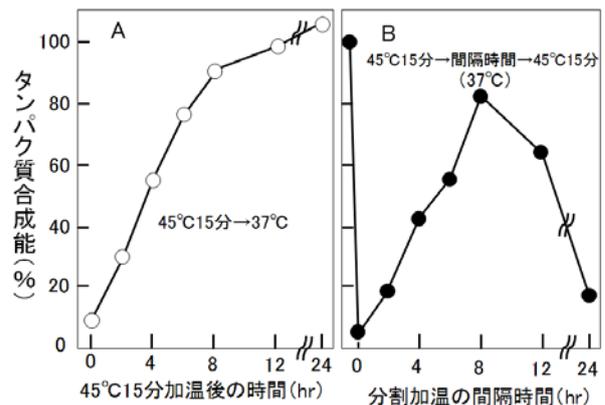


図 16

分割加温による翻訳耐性の発現。A, ラットの細胞(NRK)を 45°C15 分加温のあと、細胞を 37°Cにもどして一定時間後にタンパク質合成能を測定した。B, 細胞を 45°C15 分加温したのち 37°Cで一定時間培養し、ふたたび 45°C15 分加温した直後のタンパク質合成能を測定した(文献 24 から改変)。

から防護されているということが出来ます。これが翻訳耐性 (translational thermotolerance) という現象です [24]. mRNA からタンパク質を合成する過程を翻訳 (translation) というので、このように呼んでいます。この場合、1 回目の加温後 24 時間も経過すると、この翻訳耐性はほとんど消失しています。

細胞生存率で測定した場合、42°C以下の温度の持続加温中に温熱耐性が発現してくることをみました (図 1). それでは翻訳耐性も 42°C以下の温度の持続加温中に発現してくるのでしょうか? 図 17A には細胞を 41°Cで持続加温したときのタンパク質合成能の変化を示しています。一時的にタンパク質合成能が低下しますが 3~4 時間後には加温中にもかかわらず完全に回復しています。これは加温中の翻訳耐性の発現と見る事ができます。それでは、42°C持続加温の場合はどうなるのでしょうか? 図 17B に示すように、42°Cの加温中に 4~5時間まではタンパク質合成能は 30~40%に低下したままで回復してこないものの、それ以上は低下しないようです (図 17B, △). この状態は、細胞機能は低下しているけれどもなんとか生き

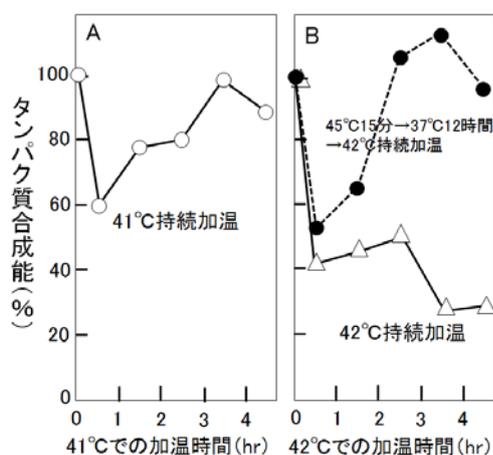


図 17

41~42°C持続加温中の翻訳耐性発現. A, ヒトの細胞 (HeLa) を 41°Cで持続加温したときのタンパク質合成能. いったん少し低下するが加温中にもかかわらずまた回復してくる. B, 42°C持続加温中のタンパク質合成能 (△) と、あらかじめ 45°C15分加温しておいた細胞を 42°C持続加温したときのタンパク質合成能 (●). 42°Cにもかかわらず 41°C持続加温のときと似た経過を示す (文献 25 から改変).

ていることを意味しています。一方、細胞をあらかじめ 45°C15 分で加温して 12 時間後に 42°Cで持続加温すると、加温中にタンパク質合成能が回復してきます (図 17B, ●). これは、あらかじめ温熱というストレスにさらされると、細胞は 42°Cの温度を 41°Cと感じているように思われます。つまり、あらかじめ弱いストレスを受けていると、強いストレスでも弱く感じるということになります [25]. このことは、私たちが少し困難な状況に直面してもそれをなんとか克服した経験を持っていると、次に大きな困難に遭遇してもあまりストレスを感じることなく、なんなく乗り越えていける、ということにも通じるのではないのでしょうか。

次に、細胞構造の一つとして、細胞骨格のアクチンストレスファイバーに対する温熱の効果を見てみます。シャーレで培養した細胞をアクチンと結合する蛍光試薬で染色してみると、多くのファイバーが観察されます (図 18A). この細胞を 45°C15 分処理するとこのファイバーはほぼ完全に破壊されてしまいます (図 18B). しかしそのあと 37°Cで 16 時間培養しているとファイバー構造がほぼ完全に回復しています (図

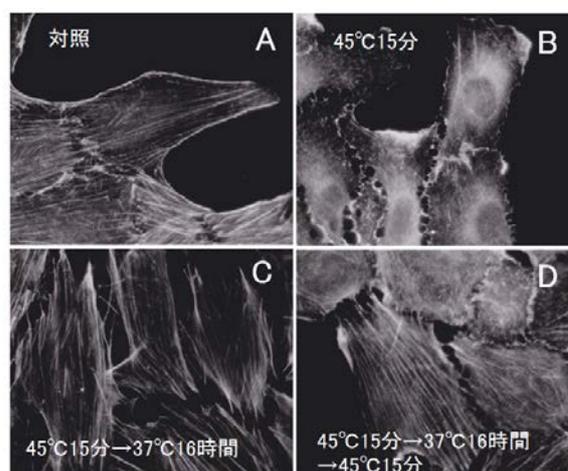


図 18

アクチンストレスファイバーの温熱耐性. NRK 細胞を用いた. A, 対照の細胞. B, 45°C15 分加温直後、ストレスファイバーはほとんど破壊されている. C, 45°C加温後 37°Cで 16 時間培養した. ストレスファイバーの形態はほぼ回復している. D, C の細胞を 45°C15 分加温した. ストレスファイバーの構造を維持している細胞が多く残っている (文献 23 から改変).

18C).ところが、ここでもう一度 2 回目の加温(やはり 45°C 15 分)をすると、このファイバーの破壊が軽減されることがわかります(図 18D).これを細胞骨格の温熱耐性(cytoskeletal thermotolerance)と呼んでいます.細胞骨格にはそのほかに中間経フィラメントと微小管がありますが、これらの細胞骨格はもともと温熱には抵抗性の構造をしているので温熱耐性は観察されません[23].

以上述べたタンパク質合成や細胞骨格以外にも、DNA 合成, RNA 合成, 細胞周期の進行, また細胞全体の形態なども、あらかじめ弱い加温をしておく2回目の加温による損傷が軽減することが報告されています[26].しかしここで述べた細胞機能や構造の温熱耐性発現・減衰の時間経過は、生存率で観察される温熱耐性発現・減衰の時間経過とは合いません.この点については次の項で考察します.

### 1-7-6 温熱耐性とはどういう状態なのか? Protection or better repair?

温熱による細胞死(増殖能の喪失)や、また細胞の機能や構造が、あらかじめ温熱によるストレスを与えておくと2回目の温熱に対して耐性(抵抗性)になる、ということは、細胞の中ではどのような状態になっているのでしょうか?熱ショックタンパク質との関連については次の章でのべますが、ここでは少し概念的に考えてみます.Laszlo は、温熱耐性というのは、温熱による初期の損傷を防護する能力が高い、と同時に、温熱により受けた損傷を修復する能力も高い状態なのではないかと提案しています[27].前の項で述べたように、あらかじめ加温しておく、タンパク質合成や細胞骨格も 2 回目の温熱から防護されています.それでは温熱による損傷からの修復(または回復)についてはどうでしょうか?図 19 を見てください.これは分割加温(1 回目が 45°C 15 分, 2 回目が 45°C 17.5 分加温)において、2 回目の加温後のタンパク質合成能と(図 19A)と RNA 合成能(図 19B)の回復の時間経過を調べたものです.2 回の加温の間隔時間が 12~24 時間ではこれらの合成能がすみやかに回復し、48~96 時間と経つにつれて回復が遅くなってきて、

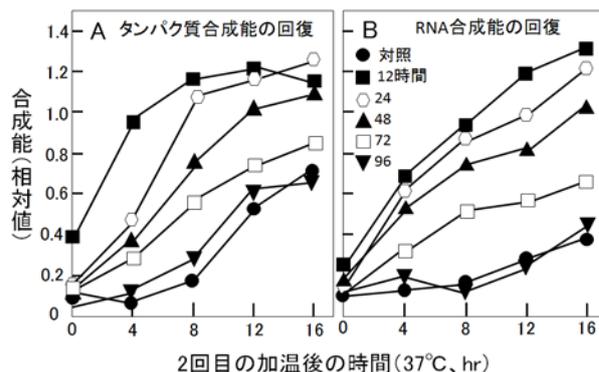


図 19

タンパク質(A)と RNA(B)合成能の回復速度. チャイニーズハムスター細胞を用いた.細胞をまず 45°C 15 分加温し、その後 37°C で 12~96 時間培養する.そのあとふたたび今度は 45°C 27 分加温し、その後の 37°C での合成能の回復を測定した(0~16 時間).最初の加温後 12~48 時間では 2 回目の加温後の合成能の回復が早くなっている(文献 27 から改変).

96 時間ではもとの細胞と同じ程度になっています.この時間経過は、まさに生存率で測定した温熱耐性の発現・減衰の時間経過とほぼ同じです.このようなことから、温熱耐性というのは、温熱というストレスに対して細胞を防護する力が強くなる(Protection)と同時に、損傷を修復(回復)する能力も高まっている(Better repair)状態と考えることができます.

### 1-7-7 アダプティブサイトプロテクション (Adaptive cytoprotection)

温熱耐性とよく似た現象にアダプティブサイトプロテクション(適応的細胞防護)というのがあります.これはラットの胃にあらかじめ弱い刺激物(たとえば、10-20%エタノール, 0.3 M 塩酸, 0.05 M NaOH, 70°Cの熱水など、これらでもかなりの刺激になると思われるが)を投与しておき、15 分後にさらに強い刺激(たとえば、100%エタノール, 0.6 M 塩酸, 0.2M NaOH, 100°C熱水)を与えると、あらかじめの刺激がない場合と比べて胃の壊死の程度が軽減する、という結果が得られました.Robert らはこの現象をアダプティブサイトプロテクションと名付けました[28].当初この現象は、細胞保護作用のある内因性のプロスタ

グランジンの産生によるものと考えられていました。最近もプロスタグランジンでこの現象を説明できると報告されています[29]。しかし、その後の研究によって、アダプティブサイトプロテクションは熱ショックタンパク質でも説明できることがわかってきています。つまり、プロスタグランジンが熱ショックタンパク質を誘導し、温熱耐性が発現することが示されたからです[20]。また、ラットをあらかじめ体全体を加温して胃に熱ショックタンパク質を誘導しておいてから、高濃度の酢酸を投与すると、その損傷が軽減することが報告されています[30]。また、エタノールなどの刺激物でも熱ショックタンパク質が誘導されるので[22]、お酒を飲むときには、最初にアルコール濃度の低いビール(5~6%エタノール)を飲んで胃の粘膜に軽い刺激を与えてストレス耐性の状態にして、あとからアルコール濃度の高い日本酒(約15%)、焼酎(20~25%)、ウイスキー(40%前後)などを飲むのが、胃にとっては優しい飲み方かもしれません。ただしあくまでも飲み過ぎには注意が必要であることは論を待ちません。

#### 1-7-8 ホルミシス(Hormesis)、放射線適応応答

ホルミシスとは、生物にとって有害な刺激でも、それが有害を及ぼさない程度であればむしろ生物に有益な刺激になる、ということで、古くから知られている現象です。「少量の毒は刺激作用がある」、「毒も薬になる」、などとも言われています。言い換えると、ホルミシスとは、有害量以下の有害な作用原が生物に刺激的(有益)な反応を引き起こすことです[31]。この作用原は物理的、化学的、生物学的のいずれでもいいのです。物理的作用原とは、これまで述べてきた温熱や放射線があります。化学的なものとしてはエタノールなどさまざまな化学物質です。生物学的作用原としてはウイルスや細菌の感染、などです。これまで述べてきた、軽い温熱処理によって細胞が次の強い温熱に対して耐性になるという現象もホルミシスの一つと言えらると思います。

ホルミシスはさまざまな作用原についての概念ですが、最近では特に放射線によるホルミシス作用を指して言及されることが多くなりました。

放射線に関しても、あらかじめ低線量の放射線を照射しておく、そのあとの強い放射線による障害が軽減するという現象が知られており、放射線適応応答として知られています。たとえば、リンパ球を低濃度の放射性チミジンであらかじめ処理してから、X線を照射して染色体異常の頻度を観察すると、その発生頻度があらかじめの照射がない場合に比べて少なくなります[32]。またマウス個体でも、あらかじめ弱いX線を照射したあとに強いX線を照射すると、あらかじめの照射を受けないマウスと比較して生存率が向上することもわかっています[33]。

低線量の放射線によるホルミシス、および放射線適応応答についてはこれまで膨大な研究成果が報告されています[30]。細菌からヒトまで、調べられた全ての実験系において低線量の放射線による有益な効果が得られています。純粋に科学的観点からみてこのような効果があると筆者も考えています。

人体へのホルミシス効果には次のような例があります。まず、放射能泉といわれるラジウム温泉やラドン温泉のある鳥取県三朝温泉周辺の住民は、これらの温泉をよく利用することから、がんで死亡する割合が周辺の地域と比べて低いことがわかっています。また、中国には自然放射能が世界平均より10倍ほど高い地域がありますが、周辺の自然放射能が低い地域の住民と比べて特に健康状態が悪いことはなく、むしろがんによる死亡率がわずかに低いことも知られています。実際の臨床においても、悪性リンパ腫の放射線治療に際して、あらかじめ弱い放射線で全身を照射したあと、強い放射線で治療したところ、治療効果が改善したという報告もあります。この場合、低線量の放射線照射は生体の免疫機能を活性化することで治療効果が向上するのではないかと考えられています。

もちろん高線量の放射線には遺伝子に変異を引き起こすなどのさまざまな有害な影響があります。しかし、低線量の放射線照射には有益な効果もあることから、放射線についての正しい知識を持って、正しく怖がる必要があるのではないのでしょうか。

### 1-7-9 適度なストレスが生体を強くする, ロバストネス, レジリエンス

38 億年におよぶ生物進化の経過を考えると, 宇宙からの自然放射線, 太陽からの強力な紫外線, また地球上のさまざまな変化するストレスの多い環境の中で生物は進化してきました. ときには大量絶滅といわれる出来事も何度も起こっており, その中で生き延びた生物が個体数を増やし繁栄するということを繰り返しながら, 現在の生命に満ち溢れた地球が形成されてきました[34,35]. したがって生物はそのようなストレスの中でも生き延びることができるように, さまざまなストレスに対する防御機構を持っています. たとえば, 低線量の放射線の照射によって活性酸素種が発生しますが, 細胞は速やかにそれらを無毒化する抗酸化酵素を誘導して処理してしまいます. また, 放射線によって DNA に損傷が生じてもそれを修復する機構をいくつか持っています. 温熱耐性や放射線適応応答もそのような防御機構であるといえます.

最近, 生物は「ロバストネス(Robustness)」である, とよく耳にします[36]. ロバスト(robust)とは, 頑強な, たくましい, がっしりした, 丈夫な, などの意味があります. その名詞形のロバストネスは, コンピュータのプログラムのエラーが生じても適宜対処して, プログラムの処理を続行したりまた中断すること, という意味があります.

生理学の分野では, 恒常性維持(Homeostasis)という考え方がありあす. これは生物を取り巻く環境がさまざまに変化しても, 体内の環境をほぼ一定に保つ機能のことをいいます. わかりやすい例は温度です. 哺乳類であればまわりの温度が低くなると, 震えが生じたり甲状腺ホルモンが分泌されて体内の代謝を活発にして熱を生産し, また皮膚の血管に血液が流れないようにして皮膚からの熱の放散を低下させ, 体温が低下しないように反応します. 逆に気温が上がってくると, 皮膚の血管を開いて熱の放散を促進し, さらに暑くなってくると発汗により気化熱を奪うことによって体温上昇を防ぐようにしています. また体もだるくなって動きがにぶくなり体内で余分な熱を生産しないように制御しています. 一方, 体内の環境も一時的

に変化することがあります. たとえば, 食事の後には血糖値(血液中のグルコース濃度, 正常値は約 100 mg/dl)が上昇(140 mg/dl 程度)しますが, すい臓から分泌されるインスリンというホルモンの作用によりまもなく正常値に戻ります. また, 血液中の水分量や塩分濃度も飲食物の影響である程度変化しますが, 腎臓での再吸収や尿量の調節によって, ほぼ一定に保たれるように調節されています.

つまり, 生物はさまざまな環境要因が少々変化しても, それにうまく対応して生体機能を維持することができるということです. 筆者はさまざまな環境要因に対する防御機能や恒常性維持機能が, 生物のロバストネスの実態ではないかと考えています.

レジリエンス(Resilience)という言葉も最近ときどき見かけます[37,38]. レジリエンスとは, もともと物理学の言葉で, 「反発力」とか「弾性力」の意味を持っています. ここから, 「外からの力が加わっても, また元の姿に戻れる力」とか「回復力」, 「復元力」などの意味で, 生態学や心理学, また社会学の分野でも使われるようになっていきます. 山火事が起こったあとの生態系の回復, 心的外傷ストレスを受けた人がそれを乗り越えてたくましく生きていくこと, 大きな災害があっても地域の人々や自治体, 国などが協力して元の街を再建していくこと, などもレジリエンスがあるということが出来ます. 個人のレベルでも社会のレベルでもこのレジリエンスをいかにして強くしていくのが課題になっています. たとえば, 個人のレベルで同じ程度の心的外傷ストレスを受けてもへこたれてしまって立ち上がれない人もいれば, それを物ともせず力強く生きていく人もいます. この違いは何なのか, またレジリエンスを強くするにはどうしたらいいのか, さまざまな観点から研究が進められています.

さて, 1-7-5 の項で述べたように, タンパク質合成や細胞骨格も温熱処理でいったんはほぼ完全に機能や構造がなくなりますが, 37°Cにおくとしばらくして回復してきます(図 17, 18). これは細胞レベルでのレジリエンスということ出来ます. ここで大事なことは, タンパク質合成についてみると, あらかじめ加温しておくと, 2回目の加温のあとの回復が速やかに起こること

です(図 19). これがまさにレジリエンスが強くなったということではないでしょうか. つまり, 最初に軽いストレスを与えておくと細胞のレジリエンス(回復力)が強くなる, ということです.

1-7-6 では, 温熱耐性とは, 温熱というストレスに対して細胞を防護する力が強くなっていると同時に, 損傷を修復(回復)する能力も高まっている状態である, と述べました. これに加えて, アダプティブサイトプロテクションや放射線ホルミシスなども考慮すると, 「適度なストレスは細胞を強くする」ということができます. 細胞レベルでのレジリエンスの強化が, そのまま個人や社会のレベルに適用できるかわかりません. しかし, 一般世間でも, 「かわいい子には旅をさせよ」, 「若い時の苦勞は買ってでもせよ」, また「鉄は熱いうちに鍛えよ」ということわざもあります. 社会的にも一度災害にあうことで, その後ハードとソフト両面で防災対策を講ずることで, 災害に強い街づくりができます.

これまで述べてきたことを簡潔にまとめると, 適度なストレスは生体を強くする, ということです. 生命は結構したたかな面があります. そんなに「やわ」ではありません.

次回からは, 熱ショックタンパク質(ヒートショックプロテイン)についての話です.

## 引用文献

1. 大塚健三. ストレスのない世界はない-細胞ストレス生物学入門-その 1, 中部大学生物機能開発研究所紀要, 16:34-44, 2015.
2. Bauer KD, Henle KJ. Arrhenius analysis of heat survival curves from normal and thermotolerant CHO cells. *Radiat Res.* 78: 251-263, 1979.
3. Henle KJ, Dethlefsen LA. Time-temperature relationships for heat-induced killing of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci.* 335: 234-253, 1980.
4. Westra A, Dewey WC. Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro. *Int J Radiat Biol.* 19: 467-477, 1971.
5. Gerweck LE. Modification of cell lethality at elevated temperatures. The pH effect. *Radiat Res.* 70: 224-235. 1977
6. Overgaard J, Nielsen OS. The role of tissue environmental factors on the kinetics and morphology of tumor cells exposed to hyperthermia. *Ann N Y Acad Sci.* 335: 254-280, 1980.
7. 菅原努, 阿部光幸編著. 「ハイパーサーミア(癌治療の新しい方法)」, p9, マグロス出版, 1984.
8. 近藤隆, 和田重人. ハイパーサーミア(温熱)の生物作用-初期過程と酸化ストレスの誘導-, 日本ハイパーサーミア学会編「ハイパーサーミアがん温熱療法ガイドブック」p124-125, 毎日健康サロン, 2008.
9. 高橋昭久. 温熱による分子損傷, 日本ハイパーサーミア学会編「ハイパーサーミアがん温熱療法ガイドブック」p126-127, 毎日健康サロン, 2008.
10. Reddy MV, Gangadharam PR. Heat shock treatment of macrophages causes increased release of superoxide anion. *Infect Immun.* 60: 2386-2390, 1992
11. Galan A, Garcia-Bermejo L, Troyano A, et al. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). *Eur J Cell Biol.* 80: 312-320, 2001.
12. Arai Y, Kondo T, Tanabe K, et al. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by local anesthetics on human histiocytic lymphoma U937 cells. *J Biol Chem.* 277: 18986-18993, 2002.

13. Hirano H, Tabuchi Y, Kondo T, et al. Analysis of gene expression in apoptosis of human lymphoma U937 cells induced by heat shock and the effects of alpha-phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) and its derivatives. *Apoptosis* 10: 331-340, 2005.
14. Cui ZG, Kondo T, Feril Jr LB, et al. Effects of antioxidants on X-ray- or hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* 9: 757-763, 2004.
15. Li FJ, Kondo T, Zhao QL, et al. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a free radical initiator, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, in human histiocytic lymphoma U937 cells. *Free Radic Res.* 35: 281-299, 2001.
16. Fernandez-Capetillo O, Allis CD, Nussenzweig A. Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med.* 199: 1671-1677, 2004.
17. Takahashi A, Matsumoto H, Nagayama K, et al. Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing. *Cancer Res.* 64: 8839-8845, 2004.
18. Takahashi A. Molecular damage: Hyperthermia alone. In *Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside* (Kokura S, Yoshikawa K, Ohnishi T, Edts), pp19-32, Springer, 2016.
19. Gerner EW, Schneider MJ. Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* 256: 500-502, 1975.
20. Kaneko R, Hattori H, Hayashi Y, et al. Heat-shock protein 40, a novel predictor of thermotolerance in murine cells. *Radiat Res.* 142: 91-97, 1995.
21. Li GC, Hahn GM. A proposed operational model of thermotolerance based on effects of nutrients and the initial treatment temperature. *Cancer Res.* 40: 4501-4508, 1980.
22. Li GC. Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *J Cell Physiol.* 115: 116-122, 1983.
23. Ohtsuka K, Liu YC, Kaneda T. Cytoskeletal thermotolerance in NRK cells. *Int J Hyperthermia* 9: 115-124, 1993.
24. Sakakibara Y, Shimada Y, Masuda A, Ohtsuka K. Development of thermotolerance in hsp70 induction-defective mutant of NRK cells. *Int J Hyperthermia* 8: 329-340, 1992.
25. Hayashi Y, Tohna I, Kaneda T, et al. Translocation of hsp-70 and protein synthesis during continuous heating at mild temperatures in HeLa cells. *Radiat Res.* 125: 80-88, 1991.
26. 大塚健三, 林康司, 山根光雄, 服部浩朋. 温熱耐性の生物学的および生化学的基礎. *日本ハイパーサーミア誌*, 8:247-274, 1992.
27. Laszlo A. The thermoresistant state: protection from initial damage or better repair? *Exp Cell Res.* 202: 519-531, 1992.
28. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, et al. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. *Am J Physiol.* 245: G113-121, 1983.
29. Takeuchi K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors. *J Physiol Pharmacol.* 65: 3-14, 2014.

30. Otani S, Otaka M, Jin M, et al. Effect of preinduction of heat shock proteins on acetic acid-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 42: 833-846, 1997.
31. Luckey TD. 放射線ホルミシス(松平寛通監訳), ソフトサイエンス社, 1990.
32. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223: 594-597, 1984.
33. Yonezawa M, Takeda A, Misonoh J. Acquired radio-resistance after low dose X-irradiation in mice. *J Radiat Res.* 31: 256-262, 1990.
34. Kolbert E. 6 度目の大絶滅(鍛腹多恵子訳), NHK 出版, 2015.
35. Kirschvink J, Ward P. 生物はなぜ誕生したのか(梶山あゆみ訳), 河出書房新社, 2016.
36. 北野宏明, 竹内薫. したたかな生命, ダイヤモンド社, 2007.
37. 枝廣淳子. レジリンスとは何か, 東洋経済新報社, 2015.
38. 川田洋一, 山口力, 梅松明. 心の病とレジリエンス, 第三文明社, 2016.