D-アミノ酸と放射線の併用効果について*

安 藤 信 親**

群馬大学医学部附属病院放射線科 (主任 戸部 竜夫 助教授)

緒 言

放射線の生物作用機構の究明は、之が完成されれば、放射線障害の防禦にも、又治療にも大きな進歩がもたらされることと期待されるが、年来行われているあらゆる方面からの諸研究者の努力にも拘らず、現在迄に知られている事は放射線の生細胞に及ぼす作用の中極めて初期のコースのみであるが¹⁻⁹⁾これを本にして近頃では従来の障害曲線のための分析から、一步進めて生化学的にも追及する方向に向つて来ている傾向で¹⁰⁻¹⁴⁾あるが生きている細胞を遠く離れては、又生物作用との関連も薄らぐ。かかる折から、我々は既に報告せる如く、酵母細胞 動物移植腫瘍その他に於いて、種々の化学物質を外から与えて、之と放射線を併用し、防禦作用或は又、増感作用をもたらしつつ、放射線の生物作用機構を考えて行く方法を年来行つている¹⁵⁻²⁵⁾。かかる方法は、やはり色々に compensate して出て来た結果を as a whole としてのみしか判定し得ないが、一方に於いて、実利的で、その結果を直ぐに応用し得るものもあると言う利点を持つている。

かかる手段を用いての研究の中、放射線の致死効果を増大せしめる増感作用及び増感作用物質の究明は、悪性腫瘍の放射線治療の向上を志す意味に於ても、Stock²⁷⁾の言う如く、当然広く基礎的研究を為さなければならぬにも拘らず、現在まで殆ど行われていない。我々は放射線の分野から悪性腫瘍をより強く攻撃する事を思いたち一方に於いて放射線に依る皮膚障害の化学

的防禦に基礎的臨床的に成功し、深部量増加を計り、他方^{22, 23, 24, 25)}抗腫瘍性物質、代謝拮抗剤・酵素阻害剤等の放射線との併用実験を行い、増感効果を見出す事に努めて来たが^{17, 19, 20, 21, 26, 29)}、私は特に近来、抗生物質中にもその存在が知られ^{30, 31)}、かつそのもの自身が代謝拮抗作用を有するものもあり³²⁾、代謝も L 型アミノ酸と異なる^{33, 34)}非天然型アミノ酸即ち D-アミノ酸と放射線の併用による増感効果に興味を覚え、酵母細胞に於いて種々検討を加え二三の知見を得、更に、動物実験を行つた所予期の成果を得て、その臨床応用の可能性を知り得たので、之を報告する次第である。

酵母細胞に於ける研究

A 実験方法

1) 実験材料並方法

実験材料として、*Saccharomyces sake*を用い P. H. 6.8-7.0 の Năgeli 液で 28~30°C で数代約 20 数日培養し、次の培養開始後第 4 日目で醗酵増殖の最盛期を数時間過ぎたものを実験に供した。この時期だと、比較的簡単に振盪に依り一つ一つに分れ得るものである。かく振盪した 0.1cc をピペットで採り、別の Năgeli 液 0.9 cc を入れた試験管に管壁につかぬ様に入れて綿栓し、更に 40 分 28°C~30°C に保温し、X 線照射した 照射前投与の場合はアミノ酸等を各最終濃度になる様この小試験管に入れて、P. H. の補正をしておく。照射後直ちに遠沈して Năgeli 液で 3 回洗滌し、同一 P. H. の Năgeli 寒天培地に適当な数になる様稀釈して撒き、移動を防ぐ為に余分の Năgeli 液を細いピペットで吸い捨てる。

照射後投与の実験には Năgeli 寒天培地に各濃度になる様アミノ酸等を入れておき、無処置で照射したものを撒いて培養した。

* EFFECTS OF COMBINED USE OF D-AMINO ACIDS AND IRRADIATION

** Nobuchika Andō : Department of Radiology, School of Medicine., Gunma University.

(Director : Asst. Prof. T. Tobe)

培養は28°C, 20時間であるが, 最初及び数時間後に同一場所を顕微鏡でみてその位置移動のない事及び発育状態を調べたが, 熟練すると, 水平に保ちさえすれば殆ど位置を移動せしめずに追及出来る。

図 1

同一箇所を容易にみる為に図1の如き直径1.5cm 厚さ3mm のガラスのリングをオブジェクトクラスに固着せしめ, グラスの下面に図1(B)の如きゲージを入れて, その交点を正しく視野の中心に持つて来て検鏡する事にした。1視野に40カ位が密集する事が影響がなく適当な数である。1実験に就き, 500ずつ4群2000個の細胞に就て生存率を算出するのであるが, D-glutamic acid の場合は16群計8000個に就て行つた。又各実験毎に必ず無処置非照射対照及び, 無処置照射対照をとつて発育率及び生存率を調べ, 前者が83~85%の場合のみを正常として採用し, 之を100%として各濃度のアミノ酸等投与の非照射対照の発育率並に照射群の生存率を補正した。

生死の判定基準は, 何時もの如く, 培養直後のまゝの一細胞, その膨化せるもの, 及び2細胞までのものを死とし, 2細胞1出芽細胞以上, コロニーを作つたものを生とした。

2) 照射条件

室温(20°C~24°C)60K.V. 3mA; non Filter

F. D. 4.5cm; 1,000r/min

3) Nigeli 培地の組成

葡萄糖	10.0g
酒石酸アンモン	1.0g
第二磷酸カリウム	0.1
塩化カルシウム	0.01g
硫酸マグネシヤ	0.02g
水	100cc

この組成は最も簡単で, その再現性は相当正確であり, この種の実験に適すると考えて, 之を採用した。寒天培地の寒天濃度は2%である。

尚P. Hは6.8~7.0で行つた。

4) 使用せる化学物質

- D-glutamic acid
- D-methionine
- D-alanine

d) DL-methionine

e) L-glutamic acid

f) L-methionine

g) L-alanine

h) L-cysteine

i) L-cystine

j) α-keto-glutaric acid

構造式

glutamic acid

(α-amino-glutaric acid)

methionine

(α-Amino-γ-methylthiol-butyric acid)

alanine

(α-Amino-propionic acid)

cysteine

(α-Amino-β-thiolactic acid)

cystine

(Di[β-thio-α-aminopropionic acid])

α-keto-glutaric acid

B 実験結果

1) D-Amino acidとX線の併用実験

予備実験として, D glutamic acid, D-methionine, D alanine等の, 10^{-3}M 10^{-5}M 10^{-7}M の各濃度で酵母細胞の発育阻害があるかどうかを検べた所, これらの濃度では1時間投与でも20時間投与でも発育に悪影響が全くなく, 100~104%の発育率を示したが, N源として酒石酸アンモンの代りにD又はL-glutamic acid alanine 等を入れてもこの酵母は増殖し得なかつた。尚L型の之等アミノ酸の影響も 10^{-3}M に

於いてglutamic acidで95%, alanine 94%, methionineで92%の発育率である他, 10^{-5}M , 10^{-7}M で悪影響はない. これ等各D型のアミノ酸並にDL-methionineを20,000r照射の前又は後に投与した結果は表1に示す如くである.

尚L型の投与の結果は表2の如くである.

表1 D-Amino acid放射線の併用効果
Saccharomyces sake(PH7.0) 20,000r

投与物質及其濃度	生 存 率 %	
	照射前投与	照射後投与
D-glutamic acid 10^{-3}M	25.5 $\pm$ 2.7	46.0 $\pm$ 4.9
D-glutamic acid 10^{-5}M	28.2 $\pm$ 3.4	50.4 $\pm$ 2.4
D-glutamic acid 10^{-7}M	29.6 $\pm$ 2.1	51.7 $\pm$ 1.8
D-methionine 10^{-3}M	38.9 $\pm$ 1.5	47.9 $\pm$ 2.3
D-methionine 10^{-4}M	42.2 $\pm$ 2.6	52.8 $\pm$ 1.9
D-methionine 10^{-5}M	46.4 $\pm$ 1.9	57.1 $\pm$ 1.6
D-methionine 10^{-7}M	47.1 $\pm$ 2.8	58.2 $\pm$ 1.5
D-alanine 10^{-3}M	45.6 $\pm$ 0.8	50.6 $\pm$ 2.1
D-alanine 10^{-5}M	46.1 $\pm$ 1.3	53.2 $\pm$ 2.3
D-alanine 10^{-7}M	48.3 $\pm$ 0.7	52.4 $\pm$ 1.6
DL-methionine 10^{-5}M	49.5 $\pm$ 2.2	58.8 $\pm$ 2.1
DL-methionine 10^{-7}M	50.4 $\pm$ 1.5	59.2 $\pm$ 2.3
Control	53.2 $\pm$ 1.8	

表2 L-Amino acidと放射線の併用効果
20,000r

投与物質及其濃度	生 存 率 %	
	照射前投与	照射後投与
L-glutamic acid 10^{-3}M	60.3 $\pm$ 1.3	68.1 $\pm$ 3.2
L-glutamic acid 10^{-5}M	63.7 $\pm$ 2.5	78.6 $\pm$ 2.1
L-glutamic acid 10^{-7}M	68.4 $\pm$ 1.8	90.4 $\pm$ 3.7
L-methionine 10^{-3}M	45.5 $\pm$ 1.6	59.8 $\pm$ 1.4
L-methionine 10^{-5}M	59.1 $\pm$ 0.9	62.3 $\pm$ 2.3
L-methionine 10^{-7}M	67.6 $\pm$ 2.1	63.2 $\pm$ 1.7
L-alanine 10^{-3}M	60.3 $\pm$ 2.7	62.6 $\pm$ 1.9
L-alanine 10^{-5}M	64.8 $\pm$ 0.6	67.5 $\pm$ 2.6
L-alanine 10^{-7}M	60.7 $\pm$ 2.4	58.4 $\pm$ 0.7
α -keto-glutaric acid 10^{-3}M	68.5 $\pm$ 1.1	65.7 $\pm$ 1.9
α -keto-glutaric acid 10^{-5}M	72.0 $\pm$ 1.8	67.2 $\pm$ 2.3
L-Cysteine	66.7 $\pm$ 2.2	74.5 $\pm$ 1.7
Cystine	70.2 $\pm$ 1.5	76.4 $\pm$ 2.4
Control	54.2 $\pm$ 2.3	

即ちD-glutamic acidに於いては, 照射前投与の生存率は対照の53%に比し25.5~29.6%と約 $1/2$ で著しい増感効果があつた. D-methionineで39~47%DL-methionineで49.5%であり, D-alanineでは46~48%でDL-methionine及びD-alanine 10^{-7}M の場合をのぞき他の何れの場合にも対照と5%の危険率で推計学的に有意の差が認められる. 照射後投与ではD-glutamic acidで生存率46~51%であり, D-methionineで48~58%, D-alanineで50~53%と何れも対照に近いが, 或はやや上廻る結果であつた. 推計学的にはD-glutamic acid及びmethionineの 10^{-3}M の場合の生存率のみ照射対照と有意の差であつた. L型投与の結果が何れも防禦的效果を示しているに反し, D型照射前投与殊にD-glutamic acidの投与はX線の致死効果を増大せしめて特異的であつた. 又, DL-methionine 10^{-5}M ではD型とL型の中間にあたる生存率であつたがD型と有意の差はない.

2) D-glutamic acidとL-glutamic acid

α -keto-glutaric acidとの同時併用実験の結果.

先の実験でDL-methionineの照射前投与の如き結果をやや追及する為, D-glutamic acidとL-glutamic acid, 或は α -keto-glutaric acidを同時に併用してX線照射し, その影響を実験した結果は表3に示す如くであつた.

即ちD-glutamic acidとL-glutamic acidの

表3 D-glutamic acidとL-glutamic acid
 α -ketoglutaric acidの併用 20,000r

投与物質濃度及び投与方法	生 存 率 %	
	照射前投与	照射後投与
D-glutamic acid 10^{-3}M + L-glutamic acid 10^{-3}M	52.8 $\pm$ 2.4	—
D-glutamic acid 10^{-3}M + L-glutamic acid $5 \times 10^{-4}\text{M}$	51.3 $\pm$ 1.3	—
D-glutamic acid 10^{-5}M + α -keto-glutaric acid 10^{-5}M	48.2 $\pm$ 2.6	54.6 $\pm$ 3.
D-glutamic acid 10^{-7}M α -keto-glutaric acid 10^{-5}M	46.7 $\pm$ 0.8	
Control	53.4 $\pm$ 1.8	

同一濃度同時併用では、照射前投与で51~53%と対照と同様の生存率であり、 α -keto glutaric acidとの併用では対照の生存率をやや下廻る結果であつた。即ち或程度D型が入ると全くL体の防禦効果がみられない。又、先に報告せる如く、防禦剤の併用必ずしも防禦効果を大にしないのみならず逆効果も起り得るのでL-glutamic acid と α ketoglutaric acid を同時併用した所表4に示す如く対照を上廻る生存率を得た。

表4 α -ketoglutaric acidと
L-glutamic acidの同時投与+X線
20,000r

投与物質及び濃度	生存率 %	
	照射前 投 与	照射後 投 与
L-glutamic acid $10^{-5}M$ + α -ketoglutaric acid $10^{-5}M$	54.6 $\pm$ 2.7	49.8 $\pm$ 2.6
L-glutamic acid $10^{-7}M$ + α -keto-glutaric acid $10^{-7}M$	57.5 $\pm$ 3.2	—
Control	53.4 $\pm$ 1.8	

表5 照射前D-glutamic acid $10^{-3}M$
投与の増感効果のL-glutamic acid,
cysteine其他に依る回復 20,000r

照射後投与物質並に濃度	生存率 %
L-glutamic acid $10^{-3}M$	49.8 $\pm$ 1.9
L-glutamic acid $10^{-5}M$	44.3 $\pm$ 2.5
L-cysteine $10^{-5}M$	58.6 $\pm$ 2.7
cystine $10^{-3}M$	55.7 $\pm$ 1.4
α -keto-glutaric acid $10^{-3}M$	44.6 $\pm$ 2.2

かくてD glutamic acidが特に照射前に投与される際同時に L-glutamic acid或は α keto-glutaric acid を存在せしめると或程度はその増感効果をおさえ得る事が知れた。

然し表3の如くそれ等単独の防護効果には遙かに及ばないものである。

3) 照射前D-glutamic acid投与の増感効果のアミノ酸等による回復実験の結果。

次でD glutamic acidの増感効果は、回復過程にL-Cysteine等を投与する事に依り回復せしめ得るものか否かを実験した結果は表5に示

す如くである。

即ち L-glutamic acidの照射後投与で44~49%, α -keto-glutaric acidで45%と何れも対照に劣る生存率であるが、Cystine及びCysteineの場合のみ56%, 58%と対照を上回る生存率であつた。

之等の中、L-glutamic acid $10^{-3}M$ 投与並にL-Cystine $10^{-6}M$ の場合は推計学的に対照と有意の差ではない。

而して之等の結果は表2にみられる如く各の単独照射後投与の結果に遙かに劣り、D-glutamic acidの増感効果は之等では完全には回復させ得ぬ事が知れた。

C 考 察

Nägeli液はアミノ酸を含まず、N源としては酒石酸アンモンが存在すれば酵母の発育増殖に足りるものである。然し酒石酸アンモンを抜いてその代りにL-glutamic acid Aspartic acid. Alanine. D glutamic acid等のアミノ酸を夫々単独に入れても発育しない。

かかるNägeli培地に入れたD-amino-acidの細胞内での運命は一般にD-amino Oxidase, Trans aminase系等に依り、L型に変えられて蛋白合成系に使われるか、或はTCA cycleを経て分解され、Energy rich bond生成に使われるかであると言われている。^{33, 34, 35)}

D alanineについては、このものはD-amino Oxidaseに依り非常に急速に分解されるものの一つである³⁶⁾。之からは図2. 3にみられる如く。

$CH_3 \cdot CH \cdot NH_2 \cdot COOH \rightarrow CH_3 \cdot CO \cdot COOH + 1$ となつて、pyruvic acidが出来てくるが、これ

図 2

から再びTrans-aminaseによつて L-alanine になるか或はD型がすぐ Rase-mase に依りL-alanine になるものであり³⁷⁾, これから蛋白合成に利用されるかT. C. A cycleにはいる. 然し表2にみられる如く L alanine 自体は放射線の致死効果を防禦して60%の生存率を得, 又 Pyruvic acidでは小池³⁸⁾の報告に依れば Competitive Protector或はRestoratorとして, SHと同様に働き得る強い反応力を有するものである. 勿論この酵母は, その増殖に alanine を必要とせず D-alanine で发育阻害されないものである.

かかるD-alanine の前投与に依り之が細胞内でいかに早く脱アミノ作用を受けるとしても放射線併用に依り, 増感効果を示した事はその作用が D-alanine 独自の関係するものと言えよう.

而して, D-alanine の照射後投与では, 増感効果は全くみられないことは他の増感剤による安藤義⁴⁸⁾安藤守²⁶⁾の結果の如くであり, D型の特異性と照射前投与の特異性がここでも明かにみられる.

D-methionineの分解は D aminoacid oxidaseに依り, D glutamic acid の約54倍も急速に酸化されて, deaminate される^{39,40)}その運命

は図3.4に見られる如く, α-keto-butylic acid に行くか, Transamination に依り L-methionineに成る. L-methionineの作用としては, 之から choline 及び cystine が作られる他に, methionine本来の作用もあらうと想像されている⁴¹⁾この methionine は動物では従来からD型でも利用されるとされているにも拘らず⁴²⁾, 私の実験では D型でも L型でも $10^{-3}M$ ではその照射前投与により, 対照を下廻る生存率をみており, D型の $10^{-5}M$, $10^{-7}M$ でも同様結果であつた事は興味深い. D.L型ではDとL型の中間の生存率を示したが, この差を明かにする意図で最も増感効果の大である D-glutamic acid を用い, 之とL型との同時併用を行つた所, 同量のL型を併存せしめてもD型の増感効果を防ぎ得ない結果であつた.

D-glutamic acid については図2.3にみる如く, そのNH基が脱れてα-keto-glutaric acid としてT.C.A cycleに入るか, 再びL型にtrans-aminated されるかであるが, このものの特異的なOxidase は存在が確認されておらず, 他に比べ D-amino-oxidase では非常に酸化され難いものである³⁶⁾.従つて之がα-keto-glutaric acid に急速に分解されて, それが防禦的に働く可能性は全くない. 若しかかる可能性があるとすれば, D-glutamic acidとα-keto-glutaric acid との併用の如き生存率となり, 特に照射前投与でも $10^{-7}M$ 程度の低い濃度であれば対照の $1/2$ と言う増感効果は現れないであらう.

細胞中にプールされているL-amino acidの量は外から与えられる低濃度のD型より常に大であらうと考えられるが, かかるL型の存在を以ても, D型の増感効果を防げない事は興味深い. 而もこの増感効果は先のD-alanine 等と同様に照射後投与では全くみられない上, 照射後に強力な回復力を有する L-glutamic acid, α-keto-glutaric acid, Cysteine, Cystine 等を与える事に依つても完全には回復せしめ得なかつた事は特異性が強い事を思わせる. 殊に Competitive Restorator であるSHの力が及

ばない事はこの増感効果が放射線の障害よりも寧ろ生化学的なD-gluamic acidの害作用が放射線で強化された結果と考えるべきであろう。

他方glutamic acidはその構造上activeなCOOH基を両端に有しており、Barron⁴³⁾は、放射線障害の防禦機構に於いてその反応性を強調しているがかかる基にCompetitive effectがあるとすれば、D型に於いても、かのDevik, F.⁴⁴⁾のCysteineの防禦実験の如くL型もD型も有効であろう。D-glutamic acidの増感作用は、故にかかる反応基を持つても放射線間接作用の細胞内重要物質に及ぶのをCompetitiveに防ぐ力はない事の証明であろう。

換言すればL-glutamic acidの防禦効果は、それが代謝に利用される事にあると言えよう。

以上D-alanine, D-methionine, D-glutamic acidを照射前に投与してL型の防護作用と逆に増感効果を得たが、この結果は前二者では殆ど問題にするに足りぬが、後者では甚しく大である。この差は之等の構造の違いより、その代謝の差、特に合成系へのincorporation等に於ける利用率の大小乃至は重要性の違いと言う事に関連があるかと考えている。Spoerl E, & Carleton, R.⁴⁵⁾に依るとSaccharomyces cerevisiaeで15,000~20,000r照射直後でalanineは72%に、methionineは54%に減少しているが、glutamic acidは102%で非照射対照と変わらないと言う。

放射線に依り基質が減少する事については、その前段階の酵素反応が阻害される為か、或は障害から回復する為に特に使われるかの二つの場合が最も考えられ易いが、前者の場合には阻害された反応の前段階の酵素反応の基質が丁度放射線に依りPyruvateの蓄積が起る如く⁴⁶⁾次々と蓄積される事になる。若しかかる結果がアミノ酸代謝殊に蛋白合成を中心として起れば、放射線に依り蛋白合成の阻害は見るべきものがある筈であるが、事實はG.Hevesy¹³⁾Abrams⁴⁷⁾等の報告の如く放射線に依る蛋白合成の阻害は殆どない。

かかる報告から考えれば先の照射直後のアミノ酸の増減は、むしろ後者の場合即ち、障害された細胞内代謝系の、この障害に打勝つ為の再編成に必要な動きと考えられる。

Competitive protectorであるCysteineの如きSH基を有するものの他のアミノ酸は、先にも触れた如く、寧ろ回復効果に勝れている結果はこの事を裏付けていよう。ここに回復と言うが、之は安藤(義)⁴⁸⁾の言う如く既に照射中に始まつている動きであり、D-amino acidを照射後に投与しても全く増感効果のみられない事は再編成の中の照射中から照射直後までの短い間に急速に行われる過程が重要である事を示すと考えられる。

別にSherman F. G.^{49, 50)}がyeastに於いて大量照射直後に於いてR. N. Aの増加が甚しい事を報告しており、他方Brachet, J,⁵¹⁾Casper-sson⁵²⁾時代から注目されていたR.N.Aと蛋白合成との関係がGale^{53, 54)}に依り見事に確認された。

之から放射線照射と併用する時のアミノ酸の利用の大きな分野は蛋白合成であり先の再編成がR.N.A増加と関連して蛋白合成の急速な展開の必要性の為の動きと考えられる。

D-amino acidの阻害作用については余り知られておらず或る種の細菌ではL-leucineとD-leucineが拮抗する報告³²⁾L-aspartic acid又はL-histidineの利用がそのD型で阻害される事^{55, 56)}等々が知られているのみであるが、殊に後者の如き場合D型とL型の量比が問題とされる⁴¹⁾。然し、ともあれ 10^{-3} ~ 10^{-7} Mと言う低濃度では夫自身は殆ど酵母の発育増殖に悪影響を及ぼさないD型が、放射線照射前に投与される時は増感効果を表し、L型或はSHでも完全に之を回復し得ず、又L型と併用しても防護効果を見ない事は先の安藤(義)⁴⁸⁾、安藤(守)⁴⁶⁾の諸報告からして、その阻害がWholley⁴⁸⁾の所謂代謝拮抗的特異的なものである事を思わしめるが、之等の確定には更に詳しい生化学的研究を要する。

殊に D-glutamic acid と X 線のかかる併用効果は悪性腫瘍攻撃への利用の可能性が期待されるので次段階の実験へ発展せしめた。

D 小 括

酵母細胞に於いて D-alanine, D-methionine D-glutamic acid 等と放射線の併用効果を追及した所、夫等の照射前投与で何れも L 型と異り放射線の致死効果を増強するが、照射後投与ではかかる増感効果がみられなかつた。

殊に D-glutamic acid の増感効果は 10^{-3}M - 10^{-7}M で生存率が 25.5~29.6% という対照の約 $1/2$ の大きな効果であつた。

この事は COOH 基を 2 つ有する L-glutamic acid にしても、その防禦作用機構は cysteine の如く放射線間接作用の細胞内重要物質に及ぶ事を防ぐ為ではなく、代謝に利用される方向が大であらうと思われる。

この D-glutamic acid の増感効果を照射後回復の過程に L-glutamic acid, L-cysteine, Cystine, α -keto-glutaric acid 等を投与して回復可能かどうかを検べた所、完全には回復せしめ得なかつた。

更に D-glutamic acid と L 型と併用しても、D 型の増感効果を全くは防ぎ得なかつた。

D-alanine, D-methionine 等の分解は、Krebs⁴⁰⁾に依ると、L 型に比しても甚だ早いと言い、又、D-methionine は L 体を代償する⁴¹⁾と言うが、かかる事がその増感効果の少い事に關係する他やはり先の Spoerl⁴⁵⁾の結果からみても細胞内代謝に於ける重要性が問題となると思われる。最近迄に微生物の中に D 体を有するポリペプチドを作り出すものが見出され⁵⁸⁾、又抗生物質の中に D 体を有するものも見出され^{30, 31)}注目されているが、その作用機構は必ずしも D 体の存在にのみ歸せられないであらう。

然し私の実験即ち栄養上アミノ酸を必要としない酵母細胞に於ける結果から低濃度の D 体殊に D-glutamic acid の果す役割は、Daunce⁵⁹⁾ Gale^{53, 54)} Hevesy¹³⁾ Abrams⁴⁷⁾等の報告を考え合せる時、変性蛋白を形成すると言う可能性は少

くても、放射線障害から急速に restore すべき代謝系のどこかで特異的阻害作用をあらわすものと思われる。

エールリツヒ腫瘍に於ける研究

先にも述べた如く放射線の治療効果を更に上げる為に、化学物質との併用に依る増感効果を広く研究する事は当然行われねばならない重要な方向にも拘らず殆ど研究されていない。

僅かに Mitchell^{50, 61)} の Synkavit その他⁶²⁾ が報告されているのみで普通は無条件で制癌剤を併せて用いているに過ぎない現況である。

既に報告せる如く制癌剤、酵母阻害剤であればどれでも又どの様な方法で放射線と併用しても効果が挙る言うものではなく^{17, 18, 20, 21, 26)} 或る一定の方向が存すると思われる。

かかる方向を探究する意図で酵母細胞に於いて D-glutamic acid の 10^{-3}M ~ 10^{-7}M という低濃度で照射前投与をした所、予期以上の増感効果をあげたが、この結果を更に腫瘍細胞で追及し、果して腫瘍を攻撃し得るか否かを検討したものである。

A 実験方法

1) 実験材料

純 DDD 系成熟雄マウスで体重 20g 前後のものをを用い秋〜初冬に実験を行つた。

2) 方法

マウス腹腔内にエールリツヒ腹水癌を移植して、第 7 日目に、血性を帯びていない腹水(癌)を採取し稀釈する事なくマウスの背部や、腰部に近い正中線部で直径 1.2cm にわたり毛を除いた真中に正確に皮下 0.1cc (約千万個)を注射し皮下腫瘍を作る。移植率は 100% であるが、第 7 日目に外測して、常に長径×短径 = $1.0 \times 1.0\text{cm}^2$ 近いものの中腫瘍部に出血、化膿等なく、壊死部を有せざるものにして、均等に膨隆せるもののみを選び実験に使用したが、皮下に移植したもの、中約 45% 使用可能であつた。

照射は腫瘍局所のみを為し、他は厚さ 3mm の鉛板にて覆い、マウスの運動に依る不正確を除く為足を厚紙に固定して照射した。

照射対照群には生理的食塩水を投与し、実験群には

局所又は腹腔内に各実験量のD-glutamic acidを投与したが、投与する液量を0.2—0.4cc以内にとどめる様濃度を考えて与えた。又移植し、照射する時間は各実験共一定の時間に行つた。

3) 照射条件

室温, 150K.V. 3mA, Cu0.5mm, F.D. 18cm, 38.96 r/min 700r 尚照射時期は移植後第7日である。

4) 効果判定法

従来腫瘍を移植した動物について此種の実験をする場合の判定法は、体重測定、又は外測により面積、体積の測定が行なわれているが、私の場合外測では増殖の再び起る時期は照射後第4日目であるが此の間、種々検討した結果、外測値と実際の腫瘍体積と大きな開きがある為、対照群及び実験群共に、照射後第5日即ち、移植後12日目に之を殺して、腫瘍を出来るだけ無菌的に剔出し、各径及び重量を測定した。

尚一部は、照射後10日即ち移植後第17日に剔出した他、別に長期観察の為1ヵ月間放置し剔出したものもある。

5) 実験内容

実験は次の如き各群に分けて行つた。

(註( )内は匹数×回数)

- a) 無処置対照群
- b) 700r照射対照群 (5×2)
- c) 移植後第7日目に腫瘍にD-glutamic acid 0.06mg局所投与せる群 (5×3)
- d) 同局注後、700r照射(局所)せる群 (5×3)
- e) 700r照射直後腫瘍及びその周囲にD-glutamic acid 0.06mg投与せる群 (5×3)
- f) D-glutamic acid 0.06mgを第7日目に腹腔内に注射せる群 (5×3)
- g) 同上処置後1時間で照射せる群 (5×3)
- h) 同上処置後2時間で照射せる群 (5×2)
- i) 同上処置後4時間で照射せる群 (5×2)
- j) 腫瘍移植後第3日目より5日間 D-glutamic acid 0.012mg腹腔内注射せる群 (5×2)
- k) 同上処置して7日目腹腔内投与1時間て700r照射せる群 (5×2)
- l) 1% Tween 0.4ccを腹腔内投与せる群 (5×1)
- m) 同2時間後照射群 (5×2)
- n) D-glutamic acid 1% Tween液腹腔内投与群 (5×1)
- o) 溶媒を1% TweenとせるD-glutamic acid 0.06mgを腹腔内投与後2時間で照射せる

群 (5×1)

p) 7日目と9日目に各350rずつ分割照

射せる対照群 (5×2)

q) D-glutamic acid 0.06mgを各照射前

1時間に投与して第7日及第9日目に各

350r照射せる群 (5×2)

r) 無処置非照射で第17日に剔出せる対照

群 (5×2)

s) 7日目700r照射後10日で剔出せる対照

群

t) D-glutamic acid 0.06mgを照射前局所

に投与して10日目剔出せる群 (5×1)

u) 移植後100%死亡する迄観察せる群 (32×1)

v) 700r照射後1ヵ月観察せる群 (20×1)

w) D-glutamic acid 0.06mg腹腔内投与の

2時間後照射し、1ヵ月観察せる群 (20×1)

尚a) b) c) d) f) g) h) v) w)の各群に就てはその1部をフォルマリン固定、ヘマトキシリン、エオジン染色下に組織学的検討を加えた。

其の他更に家兎並にマウスに於て D-glutamic acidの連続投与の毒性の有無を検討した他、マウスに於て腹腔内投与後700r全身照射に依る放射線作用の増強の有無を検討した。

又、最後にL-glutamic acidに依り、かゝる腫瘍細胞がどの様に影響されるか、及び之と放射線の併用がD-glutamic acidと同様効果を生ずるか否かを検討した。

x) L-glutamic acid 0.06mg腹腔内投与

群 (5×1)

y) 同上投与後1時間で照射せる群 (5×1)

B 実験結果

1) 対照群

実験には、先に述べた如き規準で、外測値の一定したものを選ぶのであるが、かかる撰択を経たものは、剔出後の重量測定でも、バラツキが少く、好都合であつた。

移植後7日目、9日目の腫瘍は表6に見られる如く夫々平均0.96g, 1.25g, 2.18gであつた。

移植後第7日に腫瘍のみに照射したものの第12日目の重量は1.02gである(表6)。

この際非照射並びに照射対照の一部について照射前後のマウスの体重の変化をみたところ、図

表6 対 照 群(重量はg)

	7日目腫瘍		9日目腫瘍		12日目腫瘍		7日目700r 局所照射群	
1	0.95	0.9	0.9	1.1	2.25	2.1	1.1	0.9
2	1.2	1.1	1.0	0.85	2.0	2.0	0.95	1.2
3	0.9	0.7	1.5	1.4	2.4	1.8	0.85	0.8
4	0.8	1.4	1.7	1.5	1.9	2.2	1.3	1.1
5	0.9	0.75	1.3	1.2	2.3	2.7	0.9	0.95
平均	0.96±0.23		1.25±0.28		2.18±0.28		1.02±0.13	

図 5

5に示す如くであつた。

2) D-glutamic acid局所投与実験群

a) D-glutamic acid 0.06mg を腫瘍局所及びその周囲に投与した対照群では 0.63g, b) D

glutamic acid 同量を局注後20分で照射した群では12日目の重量0.29g, c) 700r局所照射直後腫瘍のD glutamic acid 0.06mg を注射せる群の重量は0.61gであつた。この a) と, b.; b) とc) の各平均重量の差は推計学的に 95%の安全率で有意の差であつた。即ち腫瘍に対する局所投与の場合でも酵母細胞の場合と全く同様に照射前投与がより有効であり照射後投与では局注のみの場合と差がみられなかつた。

3) D-glutamic acid腹腔内投与実験群

a) 移植後第7日目に腹腔内に D-glutamic acid 0.06mg 投与した対照群の第12日に於ける重量は平均1.69g, b) 同量を腹腔内に投与して1時間後に照射せる群の平均重量は0.43g, c) 同じく2時間後に照射せる群では0.37g, d) 4時間後に照射せる群では0.65gであつた。

腹腔内に注射するという全身投与法では、或る時間をおかなければ、丁度局所投与の際の照射後投与の如き効果となると考え、時間を置いたのであるが、この際2時間後照射が最も効果を修め、照射前局注の場合に近い値を得たものである。

このa) とb) c) d) の各との差, c) とd) の差は推計学的に5%の危険率で有意であつた(表8)。

以上の1 2 3) 群の1部について組織学的な検討を加えた結果は表9に示す如くであり、局所注後照射でも、腹腔注後照射でも、核の膨化、空胞形成、濃縮化、融解等が強く、高度の壊死を生じて明かに対照より高度の障害を受けている(表9・10)。

表7 D-glutamic acid局所投与実験群(第12日目重量g)

D-glutamic acid	0.06mg 局 注 群			同局注20分後700r照射群			照 射 直 後 局 注 群		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.6	0.6	0.5	0.2	0.5	0.25	1.1	0.3	0.45
2	0.9	0.9	0.4	0.25	0.5	0.15	0.85	0.8	0.6
3	0.5	0.7	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.45	0.55
4	0.45	0.35	0.56	0.3	0.1	0.6	0.5	0.6	0.6
5	0.8	0.8	0.52	0.3	0.2	0.35	0.5	1.0	0.8
平 均	0.63±0.18			0.29±0.14			0.61±0.25		

表8 D-glutamic acid 0.06mg 腹腔内投与実験群

	腹腔内注射対照群			同注1時間後700r照射群			同注2時間後700r照射群		同注4時間後700r照射群	
1	1.5	1.8	1.8	0.3	0.3	0.6	0.4	0.35	0.65	0.75
2	1.7	1.7	1.7	0.45	0.5	0.45	0.35	0.35	0.7	0.6
3	1.6	1.5	2.0	0.5	0.4	0.4	0.4	0.45	0.55	0.5
4	1.7	1.6	1.3	0.25	0.85	0.35	0.4	0.3	0.5	0.85
5	1.8	2.0	1.6	0.3	0.35	0.3	0.3	0.4	0.8	0.6
平均	1.69±0.26			0.43±0.15			0.37±0.04		0.65±0.12	

表9 組織学的所見

組織学的所見	7日目 腫瘍	12日目	700r 照射	D-glutamic acid 0.06mg 局注	D-glutamic acid 0.06mg 腹注	D-glutamic acid 0.06mg 局注+700r	D-glutamic acid 0.06mg 腹注+700r
細胞質の空胞形成	—	—	—	—	—	+	+
核の膨化乃至空胞形成	—	—	—	—	—	卅	卅
核仁の膨化空胞形成	—	—	—	—	—	—	—
壊死	±	卅	卅	—	+	卅	卅
遊走細胞の出現	—	+	卅	—	+	卅	卅
核の濃縮化	—	—	卅	卅	+	卅	卅
核の融解	—	—	—	—	—	1	+

(—全く認めず
±僅に所々散見する   +軽度
卅中等度   卅高度
卅著しく多い)

表10 腫瘍移植後3日目より5日間
D-glutamic acid 0.012mg腹腔内
投与せる実験群

	腹腔内投与群		同投与後700r 照射群	
1	1.55	1.45	0.6	0.5
2	2.0	1.8	0.3	0.5
3	1.8	1.65	0.4	0.6
4	1.7	1.9	0.7	0.8
5	1.5	1.8	0.4	0.4
平均	1.72±0.18		0.52±0.15	

4) 移植後第3日より5日間 D-glutamic acid 0.012mgを腹腔内に投与せる実験群

D-glutamic acid 0.06mgと言う量はkg当り3.0mg, 体重50kgに150mgと言う量になるので1/5量即ち、0.012mgを投与してみたが、この際連続5日間投与と言う方法と照射を併用したところ、表10に示す如く、非照射対照では12日目の腫瘍平均重量が1.72gであり、照射せる群では照射前1時間投与で0.52gであつた。即ち、

かかる方法でD-glutamic acidを投与すると、無処置のものの平均重量2.18gに比べやや発育を阻害し、更に照射を加えると照射対照と有意の差で増感効果を示したが、先の局注後照射の効果にはやや劣る結果であつた。

5) 溶媒にTween80を使用せる実験群

溶媒にTween80を用い、之に依り吸収を速進せしめる意図で行つたこの実験の結果は表11に示す如くであつた。即ち最終濃度1% Tween液D-glutamic acid 0.06mgを腹腔内に注射した対照群の平均重量は1.60g, 投与後1時間でX線照射を加えたものは0.33gで明かに、先の無処置照射対照に比して増感効果が認められた。尚1% Tween 0.4cc投与のみでは2.0gの平均重量であり、之に2時間後700r局所照射を加えたものは、1.09gで、共に無処置対照の夫々と差が認められない。然しこの際Tweenの濃度を4%とし、その0.4ccを腹腔内に投与した非照射のものは1.86gと、無処置非照射対照より、やや少

表11 溶媒にTween80を使用せる実験群(D-glutamic acidの量は0.06mg)

	1%Tween0.4cc 腹腔内注射	4%Tween0.4cc 腹腔内注射	1%Tween0.4cc 腹腔内注射後 2時間+700r	1%T+D-glut.a. 0.06mg腹腔内注射	1%T+D-glut.a. 0.06mg 腹腔内注射 後 1時間+700r
1	1.9	1.6	1.0	1.6	0.3
2	2.0	2.0	0.9	1.8	0.2
3	2.1	1.95	1.2	1.2	0.4
4	2.2	1.9	0.8	1.9	0.25
5	1.8		1.1	1.7	0.5
平均	2.0±0.10	1.86±0.17	1.0±0.16	1.64±0.26	0.33±0.12

表12 照射後10日目腫瘍別出群

無処置非照射 Kontrol	700r照射群	照射20分前局所に D-glutamic acid 0.06 mg 投与700r照射群
2.4	2.6	2.0
2.9	2.1	1.7
2.5	2.4	1.6
3.0	2.4	1.3
3.1	2.9	2.0
2.63±0.35	1.64±0.28	1.12±0.15

表13 分割照射実験群
(7日目350r 9日目350r)

	照射対照群	照射前1時間D-glut.a. 0.06mg 腹腔内注射
1	0.9	0.9
2	1.2	1.4
3	0.9	0.7
4	0.95	1.1
5	0.8	0.75
平均	0.96±0.23	0.54±0.22

い重量であつたが有意の差ではない。

6) 照射後10日目に腫瘍を剔出せる実験群

表12に示す如く、照射後の剔出迄の期間をやや長く10日間とした場合の照射対照例の平均重量は1.64gであり、D-glutamic acid 局注後20分て照射せる例では1.12gであつた。尚この際の無処置非照射対照の平均は2.63gである。即ち、D-glutamic acid投与の方が照射対照の重量を有意の差で下廻っている。

7) 分割照射実験群

更にやや治療に近づける意図のもとに700rを

表14 死亡迄の日数と匹数(総数32匹)

日数	匹数	日数	匹数	日数	匹数
1		11	3	21	1
2		12		22	1
3		13		23	4
4		14		24	
5	1	15		25	
6	5	16	2	26	2
7	6	17	1	27	
8	1	18	3	28	2
9		19		29	
10		20		30	
計	13		9		10

平均生存日数14.8日

(但し移植後7日目を第1日とす)

2分割して350rずつ照射した実験の結果は表13に示す如くであつた。

即ち移植後第7日目と第9日目に各350r、照射した対照の平均重量は0.96gで第7日目に700r 1回照射せる対照の1.02gと差はない。各分割照射の1時間前にD-glutamic acid 0.06mgを腹腔内に投与した例では之が0.53gとなり推計学的に有意の差で増感効果を示したが、この値は表9にみられる腹腔内投与後2時間で700r1回照射した場合の0.37gにはやや劣つた(表13, 14, 15)。

8) 長期観察群

移植後12日目及び17日目迄のD-glutamic acid、投与の結果が、更に長期間置いた後にも判然と現れ得るかどうかなを見る為に、無処置非照射のものもの100%死亡する期間を検べた所、

表15 長期観察例に於ける組織学的所見
(1ヵ月生存例の1部)

組織学的所見	700r	700r+ D-glutamic acid
細胞質の空胞形成	—	—
核の膨化乃至空胞形成	—	卅
核仁の膨化空胞形成	—	—
壊死	卅	卅
遊走細胞の出現	+	+
核の濃縮化	+	卅
核の融解	—	—
核分裂像	卅	+

(—全く認めず +軽度 卅高度
±僅かに所々散見する 卅中等度 卅著しく多い)

図 6

私の移植方法だと35日で100%死亡する。依つて、照射後1ヵ月を区切つて、700r照射対照及びD-glutamic acid 0.06mgを照射前2時間に投与した群を観察した結果は、表14及び図6、7にみられる如くであつた。

即ち、無処置非照射群は100%死亡し、その平均生存日数は、14.8日、その死亡時腫瘍重量平均は2.99gであるが、7日目700r照射群では照射後第11日に死亡し始め、その1ヵ月後の生

図 7

存数は20匹中11匹、D-glutamic acidの照射2時間前腹腔内投与群では照射後第16日に死亡し始め、20匹中14匹生存している。生存者の平均重量は前者で2.06g後者では1.07gであつた。尚照射群で1ヵ月内に死亡したものの腫瘍の平均重量は対照で1.79g、D体投与例では0.96gであつた。生存せる14匹中5匹の腫瘍は0.2~0.5gであり、明かにD型投与群の腫瘍の発育は遅れており、且つ、死亡せるものの死因は必ずしも腫瘍増殖の為ではない事が知れた。尚一部の生存せるマウスの腫瘍を組織学的に検査した結果は表15に示す如くであり、照射対照に比して、D-glutamic acid投与後照射例では核の膨化、空胞形成、濃縮化、等の変化が強く、核分裂像は少かつた。

9) 700r全身照射に及ぼすD-glutamic acidの影響に関する実験例

腫瘍を移植せざる正常マウスについてD-glutamic acidの全身照射前投与が増感的効果を有するか否かを検討する為、D-glutamic acidを700r全身照射前30分に腹腔内に投与した所、図8にみられる如く、照射対照とその生存曲線に差がないものの如くであつた。即ち、正

常動物体については、腫瘍細胞に於ける如く強い増感効果がみられない如く思われた。

10) 毒性試験

体重20g前後のマウス10匹に 10^{-3} M D-glutamic acid 0.2cc10回連日腹腔内投与して体重減少、毛並、食慾、運動等の変化に依り、その毒性を検討した所、殆ど影響がみられず、死亡例はなかった。即ち、体重減少殆ど無く、運動性やや減退したが、実験後速かに回復した。

更に 10^{-2} M 0.2ccを隔日7回投与した10匹では体重減少、食慾無く、運動少くうずくまっている状態がみられたが死亡は1カ月間の間に1匹もない。体重も投与終了後1週で旧に近づいた。更に体重2.5kgの雄性家兎、匹の耳静脈に 10^{-2} M 10cc隔日5回投与しても急激な変化並びに甚しい衰弱はなく、体重減少も少なかった。 10^{-3} M 5cc連日15日間投与しても、外から何等変化なく体重減少も無く生存した。

以上からみてD glutamic acidの少量連用時大きな毒性を示さず静脈内投与も可能らしい。

11) L-glutamic acid投与実験群

酵母細胞に於けると異なり、腫瘍細胞は薬物或は放射線の感受性が大であるので、L体にてD体同様の影響があるが、更にL体と放射線と併用しても増感効果を生みはしないかと言う懸

念も生ずるので、一応最後にL-glutamic acid腹腔内投与実験を行ったところ、表16に見られる如き結果であつた。

即ちL体0.06mg 腹腔注のみでは第12日目の腫瘍重量 2.16g と無処置非照射対照の 2.18g と全く差がない値であり、腹腔注後1時間で700r照射せるものは 0.97g と表6の照射対照の値と差がなかった。

即ち腫瘍に於いても、L体では増感効果がみられず、かかる投与方法では殆ど発育に影響がみられないことが知れた。

表16 L-glutamic acid投与実験群
(腫瘍重量g)

L-glutamic acid	腹腔内投与例	腹腔注後照射例
1	2.6	0.85
2	1.9	1.2
3	2.1	1.1
4	2.4	0.9
5	1.8	0.8
平均	2.16 ± 0.38	0.97 ± 0.17

C 考 察

現在迄の所D-amino acid に関しては、毒性応用等についても殆ど研究されておらず、専ら将来に待つ所が多いものであるが⁴²⁾先にも触れた如く、微生物の或るものがD体を含んだ化合物を産生する事、抗生物質の或る者にD体が入っている事等が近頃注目されている^{31, 42, 58)}。

腫瘍に関しては、Kögl他^{38, 34)}が、悪性腫瘍中に多量存在すると報告してより、之をめぐり、賛否交々報告されているが^{45~48)}他方、Vlés他⁶⁹⁾に依ると、テール癌でD-glutamic acidの投与が、その発育を強く阻止すると言っている。

若し Kögl 等の言う如く、悪性腫瘍中にD-glutamic acid が存在するとすれば、当然その分解合成系の活性も高く、或る種の微生物に於

けると同様に^{30,31,58)} D体を含んだ高分子も存在すると見られる。かかるところへ、外から D-glutamic acid を与えても、先の酵母細胞に於ける D-alanine, D-methionine の如く、急速に分解利用されて、放射線併用に依り、増感効果を現わすとは考えられない。

然るに、私のエールリツヒ皮下腫瘍に於いては、0.06mg 1回又は0.012mg 5回連続全身投与でも、局所投与でも、私の判定法では、発育を阻害し、更に増感効果を生んでいる。かかる所からみれば、エールリツヒ癌に於いては、D体の利用が行われないと見る方が良いと思われる。

かかるD-glutamic acidに感受性を有する腫瘍に於いて、先の酵母細胞での実験結果を拡大検討したのであるが、局所投与例でも全身投与例でも、増感効果を生んだのは、照射前に腫瘍内にD体が入っている様な投与方法を取った時のみであつて、局注直前照射ですら、全くこの作用がみられなかつた事は先の酵母に於けると全く同様であつた。之はかかる増感機構が、一般性を有するものと考えられる。既に我々が屢々強調している事実を、ここに再び見た迄ではあるが、従来の化学物質と放射線の併用治療に於いて、この事を考慮する必要を強調したい。即ち腫瘍細胞の感受性が大きい事を念頭においても、尚一般に増感効果を得る為には、出来得れば特異的阻害剤の照射前投与をすすめるものである。安藤(守)³⁰⁾の報告に見られる如く、全身投与の場合照射2時間前投与が最も増感効果に勝っている結果が得られた。私の場合は1時間後照射と有意の差ではなかつたが之は、アミノ酸と、プリン体との吸収分解の速度が異なる為と思える。Heimberg, M 他⁷⁰⁾に依ると、labelled amino acid の注射後、その利用は2時間迄に殆ど行われると言う速さであり、D体の分解→利用の過程或は排泄も早いと想像されるので、当然8-azaguanineの場合より早く照射した方がいい結果と思われたが、1~2時間で変らない結果であつた。

之はD-glutamic acidの分解系がすぐれていないと考える先の見方が正しいのではなからうか？この場合当然その毒性が問題になるが、正常マウスに於ける D glutamic acid の毒性は 10^{-3} M 0.2cc, 10日間、或は 10^{-2} M 0.2cc, 隔日7回夫々腹腔に投与しても余り認められないので、腫瘍を有するマウスに0.06mg を1回与える事は量として、毒性の点からは大量に過ぎる事はないと思われるが、Niuen⁷¹⁾北野⁷²⁾佐藤⁷³⁾等の報告の如く過剰なアミノ酸の投与では、アミノ酸量比の不均衡を来す結果、障害があらわれるので、かかる問題をD glutamic acid投与についても考慮する必要がある。私の使用量を持続する事についても生化学的検討を加えれば或は、何か代謝異常が出る量かも知れない。

然し、家兎に於いて静注が可能であつた事は臨床への希望を持たせる、かかる治療の実際に近づける意図で0.012mg ずつ与え、又は分割照射した結果から、前者では重量0.52gで、局所注射後照射の0.29gには劣るが充分増感効果を得ており、かかる量、即ち0.6mg/kg~1mg/kgで連日与える如き方法が取り得よう。之と分割照射のモデルとして、二分割して照射しても1回照射と同程度の効果を上げ得た事とは、共に或程度臨床応用の可能性を示すものの如くである。

然し此処で、もう一度かかる攻撃方法に対する種々な腫瘍の感受性の問題を考慮する必要がある。かかる問題の中には、腫瘍への到達速度及び量を大とすれば、解決出来ると考えられる分野もあり、その為には、どうすればよいかを探索したものであるが、ここに Schmid, O. J.⁷⁴⁾の界面活性剤が悪性腫瘍治療に有効と言う報告及び戸部⁷⁵⁾の同様な基礎実験結果があり、私は界面活性剤を利用して、D-glutamic acidの腫瘍への到達量及び速度の増加を計り、同時に活性剤と放射線の併用効果を期待して、Tweenを撰んだが、Tween 80の1~4%のみでは増感効果がない結果であつたが、溶媒として使う時は1%Tween液としてD glutamic acid

0.06mg腹腔内投与+X線で0.32gと言う値からかかる併用に使える濃度が存するのではないかと思われる。次に照射前投与に依る増感効果が腫瘍以外の担体臓器組織にも同様に起るとすれば、之はD体の毒性と共に困った事である。そこで直接に700r全身照射で生存曲線を比較検討したが、照射対照と差がない様であり、腫瘍に対する照射のみの3倍と言う増感効果は、そのまま正常組織には及ばない様にみえる。この差は肝腎等でD-glutamic acidの分解を行い得る事にも存しよう。

腫瘍細胞では、酵母と異りL-glutamic acidでもその投与で発育が阻害され放射線との併用でD体同様増感効果をあらわす懸念も存するので、L体投与及び照射前投与を各一群につき行つた結果は酵母細胞に於ける如き防禦効果は示さないが、増感効果を生む事もなかつた。

この事は、かかる腫瘍ではSHの如き強力なCompetitive protectorでなければ放射線障害を防ぎ得ない事及びあらゆる物質についての感受性が腫瘍では高い事を示している。

同時にD-glutamic acidの増感効果がやや一般性を有している事を証したものである。

D 小 括

以上の結果をまとめると、先の酵母細胞に於けるD-glutamic acidの増感効果は、果して、悪性腫瘍細胞に於いても適用出来るか否かを知る目的でエールリツヒ皮下腫瘍に於いて、放射線と併用せる結果、腫瘍に於いても、移植後7日目に、D-glutamic acid 0.06mg局注実験では、照射前投与で0.29g照射直後投与で0.61gの重量を示し、明かに前者の増感効果が勝れている事が知れた。後者の値はD体のみ局所投与の際の値0.62gと変わらない。

全身投与でも照射前1又は2時間投与で夫々0.43g, 0.37gと増感効果を示したが腹注後4時間照射では0.65gと先の局注のみの値と差のない値を示したがそれでも腹腔内投与のみの1.69gよりは遙かに小さい。

かかる勝れた増感効果の臨床応用への可能性を知る為に移植後第3日より5回0.012mgずつ腹注し或は350rずつ2分割照射した結果、前者では0.52gと無処置照射対照の1.02gの約半分の値を示し、後者でも0.54gと前者と同一値を得た。

かかる増感効果を得る結果は照射後10日で剔出した場合は非常に明かではないが、照射後1ヵ月後、無処置非照射対照の100%死亡する時期に於いても、700r局所注射のみの群では腫瘍重量が平均2.0gであるに對し、D-glutamic acid 0.06mg 照射2時間前投与群では1.0gと半分であり、前者の死亡数9匹に較べ6匹であつた。

又界面活性剤の効果を利用して、D体を迅速且多量に腫瘍内に到達せしめんとして種々実験した結果Tween80には1%では、之のみで腫瘍の発育を阻害しないが、之を溶媒としてD体0.06mg腹注し1時間後に700r局所照射した群では平均0.33gとこの実験での照射対照の1.0gの1/3の値を示した。之は水に溶かしたD体腹腔注1時間後の値0.43gより小さく、全身投与による実験としては最も増感効果を挙げたものである。

酵母細胞と異り、諸種の化学物質又は放射線等に対する感受性の大きいエールリツヒ皮下腫瘍ではD体のみならずL-glutamic acidに依つても発育阻害がみられ、放射線とL体の併用に依つては、D体の場合の如き増感効果を得るのではないかと懸念されるのでL-glutamic acid 0.06mg腹腔内注及び同処置後700r照射した結果はこのL体では、かかる効果が全く認められなかつた。よつて、かかる増感効果はD体に特有な効果である。

尚毒性試験の結果以上の実験の如きD体の使用量ではマウスに於いて致命的毒性を有さない如くであつた。

総 括

栄養上glutamic acidを全く要求せず、酒石酸アンモンをN源とする、Nägeli培地で発育増殖するSaccharomyces Sakeに於いて、発育に阻害のない $10^{-3}M \sim 10^{-7}M$ の濃度でD-glutamic

acidを投与して、放射線と併用した所、従前の Antimetabolite 等の併用の場合と同様照射前投与の場合のみ著しい致死率を示し、対照の倍と言う増感率を示し照射後投与ではかかる効果を見なかつた。

この増感効果に関して更に検討し防禦効果の みられる L体の同時併用でも、之を完全に防ぎ得ず又回復過程即ち、照射後に L-glutamic acid, L-Cysteine等の強力な回復剤を投与しても、やはり完全には障害を戻し得なかつた。この事は、このものの増感機構に関して興味深い事である。若し glutamic acidに Competitorとしての効果があれば Cysteineでは D体も有効である報告⁴⁴⁾と同様、利用されない D体も Protectorになる筈であるが事実は逆に D-glutamic acidが防禦効果のない事はこの COOH基を 2つ有する amino acidの L体の防禦効果は Indirect actionの Competitionでなく代謝に使われる事に依る効果と考えられる。

D-methionine, D-alanine の照射前投与でも対照を下廻る生存率であつたが、D-glutamic acidの増感効果には遙かに及ばない。之は前二者の代謝速度及び過程が D-glutamic acidと異なり、L体となつて利用され易い事も関係している様に考えられるが、若し alanineなら Pyruvateか L-alanineになるわけで、之等のものは増感効果を示さないで放射線障害を防禦するものである。

故にかかる D体の増感効果は、D体自身の効果であり、増感効果に差のあるのは、夫々の物質が先にも述べた如く放射線照射中に既に開始される障害からの回復の動きの中で働くと考えられるが、その働きが細胞にとって重要であるか否かの現れであつて、D体の皆が同一場所に障害作用を有するものではなからう。

次に以上の酵母細胞での D-amino acidの増感効果は果して一般性を有するか否か、又腫瘍の攻撃に利用出来るか否かをエールリツヒ皮下腫瘍で検討した結果はやはり、照射前投与の場合のみかかる効果がみられた。之について

Segal⁷⁶⁾の報告によれば、SH-Enzyme に対する放射線障害を基質で防護する場合にも照射前に基質を与えなければ効少ないと言うが逆の阻害剤の場合でもかかる事がみられようし、又腫瘍細胞では Marshak⁷⁷⁾ Shemin D⁷⁸⁾ Winnick 他⁷⁹⁾等によれば投与物質が遅く入り遅れて排出されると言い、更に照射された腫瘍では周囲の血管の状態も変化し滲透も少い如く思われる等々をみても照射前投与に増感効果がある事はうなずける。

腫瘍中の D-glutamic acidの存在が論議されているが^{63, 64~68)}このエールリツヒ腫瘍では D体を投与するのみで発育増殖が阻害され、照射前投与により著しい増感効果を得た事から考えるとこのものの利用系は存在しないらしい。

然し抗腫瘍性を有する故にのみ増感効果があるのであると言う見方は当たらない。此の D体の発育阻害作用は望月⁸⁰⁾によれば吉田皮下腫瘍でみられないが、尚照射前投与で増感効果が、あると言う。

かかる所よりすれば D-glutamic acid照射前投与に依る増感効果はやや一般性を有する如くである。

更に長期観察の結果 350r 2 分割照射又は 0.06 mg の 1/5 即ち 0.012 mg 5 回腹注 + X 線でも、照射前投与の増感効果を得た事は臨床応用の可能性を思わしめる。

その増感作用機構の細部に関しては更に深い生化学的検討を必要としようが、ともあれ私は酵母細胞に於いても、腫瘍細胞に於いても、D-glutamic acidの照射前投与で著しい増感効果を始めて得た。D-glutamic acid自身の毒性については、私のマウス、家兎に於ける実験、望月のラツテに於ける研究によると 1~5 mg/kg 連日投与位までが可能であり、照射前 10^{-3} M ~ 10^{-7} M 或は 0.012 mg ~ 0.06 mg で効果を有した事から実用へのみちはあり得ると考えられる。

結 論

私は酵母細胞 *Saccharomyces sake* エールリ

ツヒ皮下腫瘍に於いてD-glutamic acid, D-alanine, D-methionine 等D体と放射線の併用に関して、種々実験研究した結果次の如き結論を得た。

- 1) 酵母に於いて D-alanine, D methionine 及び D-glutamic acid $10^{-3}M \sim 10^{-7}M$ の照射前投与に依り L体投与と異り増感効果を得た。殊に D glutamic acid では対照の1/2の生存率という著しい効果を得た。照射後投与ではかかる効果は全くみられない。
- 2) D glutamic acid の増感効果はL体、 α -keto-glutaric acid の同時併用でも、完全に防ぎ得ない。
- 3) 又この増感効果は照射後L-glutamic acid, Cysteine, Cystine 等を投与しても回復せしめ得ない。
- 4) かかる増感効果から L-glutamic acid の防禦作用機構は COOH 活性による放射線間接作用質の Competition ではないと思われる。
- 5) D体の分解等の利用路並にその速度を考える時 D体の増感効果は、D体独自の働くところに依ると考えられる。
- 6) エーリツヒ皮下腫瘍に於いて、D-glutamic acid 0.06mg の局所投与で700r照射前投与の増感効果が勝れている。然し L体ではかかる作用がみられない。故に照射後投与の効果の少いのは、局所への到達量の如何の問題でなく、本質的な差である。
- 7) 腹腔内投与では2時間後投与で局所投与と同様の増感効果を得た。4時間後照射では効果が落ちた事は照射迄に分解排出等により消失する事の不利を示すと考えられる。
- 8) 700r 2分割(350×2)、或はD-glutamic acid 0.012mgずつ5回投与でも1回投与後1回照射と同様の効果が得られた。
- 9) Tween 80 等界面活性剤を溶媒として照射1時間前全身投与する方法に依り局所投与と同様の効果が得られた。
- 10) 長期観察結果でも D-glutamic acid 照射前投与はX線単独の効果に勝る事が知れた。

11) 腫瘍の担体であるマウスには0.06mg のD-glutamic acid を全身照射前全身投与しても700rのX線単独の致死効果をより大ならしめない。

12) D glutamic acidの毒性はマウスに於いても家兎に於いても非常に強いものではなく少量連続投与が可能である。

終りに臨み群馬大学戸部助教授の御指導、御校閲を深謝し、久留米大学尾関教授の御校閲を深謝する。

尚本論文の一部は14回15回日医放総会関東部会及び北関東医学会等に於て報告した。

文 献

- 1) Timofieff-Ressousky, N. W. et al. : Das Trefferprinzip in d. Biol., 1947.
- 2) Lea, D. E. : Action of rad. on living cells, 1947.
- 3) Risse, O. : Strahlen Therap., 34 : 578, 1929.
- 4) Fricke, H. : Cold Spring Harb Symp., Quant Biol., 2 : 241, 1934.
- 5) Weiss, T. : Nature, 153 : 748, 1944.
- 6) Dale, W. M. : Brit. J. Rad., 16 : 171, 1943.
- 7) Barron, E. S. G. et al. : J. gen. physiol., 32 : 179, 1948.
- 8) Patt, H. M. et al. : Sciece, 10 : 213, 1949.
- 9) Bacq, Z. M. et al. : Bull. Acad. Med. Belg., 17 : 13, 1950.
- 10) Barron, E. S. G. et al. : Biol. Antioxidants, (Ed. by Mackenzie) 81, 1950.
- 11) Van Bekkum, D.W. et al. : Brit. J. Rad., 27 : 127, 1954.
- 12) Butler, T.A.V. : T. chem. soc., 3268, 1952.
- 13) Hevesy, G. : Nature, 163 : 869, 1949.
- 14) Harrington, H. et al. : Arch. Biochem. Biophys., 54 : 6, 1955.
- 15) Haward, A. : Ionizing Rad. & cell metab. [Ed. by G.E.W. wolstenholme. et al.] 196, 1956.
- 16) Forssberg, A. et al. : Exp. cell. Res., 7 : 480, 1954.
- 17) 安藤(義)他 : 昭医誌, 15 : 217 : 1955.
- 18) 安藤(義) : 日医放誌, 15 : 61, 1955.
- 19) 安藤(義)他 : 昭医誌, 15 : 239, 1955.

- 20) 安藤他：北関東医誌，7(2)：221，昭32.
- 21) 安藤他：北関東医誌，7(2)：226，1957.
- 22) 安藤(義)他：臨床内科小児科，11(8)：533.
- 23) 安藤(義)他：昭医誌，15：356，1955.
- 24) 吉沢：昭医誌，17(2)：84，1957.
- 25) 山内：昭医誌，17(2)：38，1957.
- 26) 安藤守明：北関東医誌，7：247，1957.
- 27) Stock, C.C. : Adv. in Cancer Res., 2 : 425, 1954.
- 28) 村山：日医放誌，17：326，1957.
- 29) 杉森：日医放誌，17：977，1957.
- 30) chem fo penicillin : Science, 102 : 627, 1945.
- 31) Syngé : Biochem. J., 39 : 363, 1945.
- 32) Fox.S.W. et al. : J. Biol. chem., 155 : 465, 1944.
- 33) Sumner, T.B. : The Enzyme, 6 : 1, 1950.
- 34) Baldwin, B.A.E. : Dynamic aspects of Biochem, 1952.
- 35) Sacks, J. : Isotopic Tracers in Biochem & physiol., 1953.
- 36) Felix, K. et al. : Z.physiol. chem., 258 : 16, 1939.
- 37) Wood, W.A. et al. : J.Biol. chem., 190 : 403, 1951.
- 38) 小池：日医放誌，15：1124，1956.
- 39) Bender, A.E. et al. : Biochem. J., 46 : 210, 1950.
- 40) Krebs, H.A. : Biochem. J., 29 : 1620, 1935.
- 41) 内田：最近の蛋白質とアミノ酸：1954
- 42) 市原：蛋白質及びアミノ酸の生化学.
- 43) Barron, E.S.G. : Symp on Radiobiol. 1952.
- 44) Devik, F. : Brit. J. Rad., 27 : 463, 1954.
- 45) Spoerl, E. et al., J. Biol. chem., 210 : 521, 1954.
- 46) Dobrovolskaia-Zavadskaia. N. et al. : J. Rad., 33 : 237, 1952.
- 47) Abrams, R. : Arch. Biochem., 30 : 90, 1951.
- 48) 安藤(義)：第81回日医放関東部会放射線生物学シンポジウム，1956，7月.
- 49) Sherman, F.G. : Fed. proc., 13 : 136, 1954.
- 50) Sherman, F.G. : Biochem. aspects of Basic Mechan in Rad. (Ed. by patt.H.M) 54, 1954.
- 51) Brachet, J. : Arch. biol., 53 : 207, 1941.
- 52) Caspersson, T. : Symp. Soc. Exptl' Biol., 1 : 127, 1947.
- 53) Gale, E.F. et al. : Biochem. J., 59 : 675, 1955.
- 54) Gale, E.F. et al. : Biochem. J., 59 : 661, 1955.
- 55) Graham et al. : J. Biol. chem., 185 : 97, 1950.
- 56) Edelbacher, et al. : Hoppe-Seylers Z., 191 : 225, 1930.
- 57) Wholley, D. W. : A. study of Antimetabol, 1952.
- 58) Brockner, et al. : Ztschrt. Immunitäts., 90 : 304, 1937.
- 59) Daunce, A.L. : Enzymolog, 15 : 251, 1952.
- 60) Mitchell, J.S. : Brit. J. cancer, 7 : 313, 1953.
- 61) Mitchell, J.S. : Radiobiol. Symp. 1954.
- 62) greenstein, T.P. & H. Alexander, : Adiv in Cancar Res, 5(2) : 474, 1954.
- 63) Kögl & Erxleben : nature, 144 : 111, 1939.
- 64) Kögl & Erxleben : Hoppe-Seylers Z., 258 : 57, 1939.
- 65) White & White : J. Biol. chem., 130 : 435, 1939.
- 66) Arnow, et al., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 43 : 766, 1940.
- 67) Town : nature, 145 : 312, 1940.
- 68) Ritten berg et al. : J. Biol. chem., 133 : 737, 1940.
- 69) Vlès, F. et al. : Compt. Rend. Soc. Biol., 191 : 350, 1930.
- 70) Heimberg, F. et al. : J. Biol. chem., 208 : 725, 1954.
- 71) Niuen, et al. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 63 : 106, 1946.
- 72) 北野：大阪医，26：1927，1927.
- 73) 佐藤：大阪医，29：295，1930.
- 74) Schmid, O.T. : Mediz(Stuttgart), 988. 1955.
- 75) 戸部：未印刷
- 76) Segal, et al. : J. Biol. chem., 204 : 265, 1953.
- 77) Marshak, A. : J. gen. physiol., 25 : 275, 1941.
- 78) Shemin, D. et al. : J. Biol. chem., 153 : 401, 1944.
- 79) Winnick, T. et al. : J. Biol. chem., 173 : 189, 1948.
- 80) 望月：第17回日医放総会発表.