X線障害に対する化学的防禦機転に関する研究

西 野 卓 朗

群馬大学医学部附属病院放射線科 (指導 戸部竜夫 助教授)

緒 言

水をX線照射するときH原子及びOH根が生成することについて最初に記載したのはRisse¹⁾であつた。次いでFricke等^{2~6)} Dale^{7,8,9)}は放射線が溶媒に対して作用を及ぼし、溶質に対しては直接に作用しないことを明らかにした。更にWeiss¹⁰⁾, Dainton¹¹⁾がこれらの証明を推進した結果、従来の弾説を主体とする直接作用説の不備を指摘又は充足するものとして間接作用説の意義が明らかにされるに到つた。一方酸素の存在によつて放射線感受性の高められることがHolthusen¹²⁾によつて記載され、低酸素状態に於いて放射線抵抗性の招来されることがCrabtree, Cramer¹³⁾によつて観察された。次いでThoday, Read^{14,15)}, Read¹⁶⁾は活性水の反応の見地から低酸素状態に於いて生ずる放射線抵抗性を解釈し得るものとした。

又、Barron等¹⁷⁾, Patt等¹⁸⁾, Chapman等^{19,20)}のglutathione, Patt等^{21,22,23)}のcysteine, Smith等^{24,25)}のBALによる化学的防禦作用が発見されるに及んで、放射線による酸化反応は放射線作用の重要な因子として重視されるようになり、且つ化学的防禦機転の解釈に際してこの立場がとられると共に、多数の研究者等^{26~31)}によつて所謂酸素効果なるものが補足されるようになった。

呼吸毒、特にcyanideの放射線との併用効果は、その酵素学的性質を酸素効果と関連させて考察することが出来るために研究に用いられており、その実用的価値は別として理論的に重要な意義を有し、放射線作用に対する変更因子の機転追究にとつて重要なものとされている。然しながら、NaCN, NaN₃等、呼吸毒の併用効果に関する結果は、動物の種、指標の種類に

よつて異つている (防禦或は増感効果)^{32~48)}。従つて酸素効果との関係に対して解釈の一致を見てない現状である。

cysteine, homocysteine, glutathione, cysteamine, cystamine等SH化合物の防禦機転に関しては、そのSH基の特異性が考えられるが、SH基を有するものでも、例えばergothionine, pantotheine⁴⁹⁾, dimethylcystine, β -mercaptopropionic acid⁵⁰⁾には防禦作用が認められていない。又、SH基を有しない化合物、例えばascorbin酸、各種硫酸塩(NaHSO₄, Na₂S₂O₅)の防禦作用が必ずしも常に認められない事実からすればSH基の還元作用にのみ防禦機転を求め難いと思われる^{25,51,52,53)}。

目 的

以上の考察に基づき吉田腹水肉腫細胞の嫌気性代謝について化学的防禦機転を追究する。

実験方法

1. 実験動物

埼玉系雑種大黒鼠の腹腔内に吉田腹水肉腫を移植し約4日後に腹水を採取して実験に供した。

2. 腹水細胞懸濁液調製

0.1~0.3c.c.の腹水を採取し直ちに5.0c.c.のKrebs-Ringer-bicarbonate液 (以下K.R.B液と略称す) に懸濁して遠心沈澱を行う (1200回3分間)。

其の沈澱に対して混在赤血球破壊の目的を以つて蒸溜水1.0c.c.を加え、駒込ピペットを用いて充分混釈してから (約20回)、更にK.R.B液4.0c.c.を加えて再び遠心沈澱を行う (1200回2分間)。

この沈澱にK.R.B.液を適量加えて、1mm²中の細胞数を300~500個に調整する。次いでこの懸濁液をフラスコ内に3.0c.c.注入して後、開口部をゴム栓にて密閉し、フラスコ底面からX線照射を行う。

3. 照射方法

1) 装置: 島津製作所製 深部X線 治療装置 (博愛号)。

2) 条件: 150KVP, 3mA, 0.5Cu+0.5Al, 12cm, $4^2 \times \pi \text{cm}^2$ (円形照射野), 半価層0.98mmCu, 95r/m, 5700r (60分間)

4. 酸素効果

1) 20% 酸素源として空気をういた。懸濁液調製後、液中に小硝子管を挿入して5分間通気を行い、次いで振盪前のガス交換に際し外気の混入を防止する目的を以つて、フラスコをマンローメーターに連結し、各活栓部を閉じて照射する。

照射終了後側室の3%葡萄糖0.3c.c.を主室に傾注し、予め焼灼還元銅法によつて酸素を除去した窒素ガスに対して炭酸ガスを5%の割合に加えた混合ガスを、前述と同様、液中に小硝子管を挿入して5分間通気してから、その500c.c.をガス交換に供した。

2) 100%酸素源: 市販の酸素ポンペを用いた以外は1)と全く同一の方法によつた。

3) 100%窒素源: 市販の窒素ポンペを1)における如くして酸素を除去して使用した以外は前二者と全く同一である。

1), 2), 3), は同一の鼠から採取した細胞を用いた(5例)。

4) 測定方法: 腹水採取から測定開始迄の時間は約2時間であつた。X線管焦点からの熱伝播による温度上昇は約5~7°Cであり、非照射の対照は電氣的熱源に対して適当な距離を選んで同程度の温度上昇を得るようにした(室温15~20°C)。恒温槽内に入れてからマンローメーターの活栓を開き、3分間放置して温度の概略の平衡を待ち、次いで活栓を閉じ振盪する。振盪開始5分後を測定開始時、即ち0分とし、60分目迄10分毎に読む。

5) 測定結果: 60分間の値を20%酸素の非照射対照に対する%として表わす。

5. cysteine: cysteine-HCl (東京化成工業製)を懸濁液3.0c.c.に対して3.0mgの割合に溶解し(終末濃度 $6.7 \times 10^{-3} \text{Mol}$)、次いで1.0N.NaOH液を加え、pH試験紙を用いて、pHを7.6に調整する。照射中のガス条件、照射後の処理は4.1)と同一である(5例)。

6. NaCN: Sodium cyanide (関東化学製)を懸濁液3.0c.c.に対して0.5mgの割合に溶解し(終末濃度 $1.63 \times 10^{-3} \text{Mol}$)、1.0N.HClを用いて中和した以外は上述と全く同一である(5例)。

尚、5.6.の対照に対してはNaClを加えて等Mol.とした。

実験結果

1. 酸素効果

1) 20%酸素中の照射による代謝値は、対照に対して51.9%であり、この減少は有意である。

2) 100%酸素中の照射においては、非照射の懸濁細胞は1)の対照(非照射)に対して90.3%(その差は有意でない)、照射した懸濁細胞は46%に低下し非照射対照(100%酸素)に対し有意の差を示した(但し1)の照射懸濁細胞との差は有意でない)。

3) 100%窒素を用いたものにおいては、1)の対照に対して非照射のものは99%(その差は有意でない)、照射した懸濁細胞は64.6%に低下し、非照射(100%窒素)並びに1)の照射(20%酸素)に対して有意の差を示した。

(表1. 2, 図1. 2. 3, 参照)

2. Cysteine 併用

単独投与により、非照射対照の124.6%に増加し、その差は有意である。併用により、その低下は86.8%となり、増感される結果を得た。

(表3. 4, 図4. 5. 6, 参照)

3. NaCN併用

単独投与により、非照射対照の137%に増加し、その差は有意である。併用により、26.8%に低下し、増感される結果を得た。

(表5. 6, 図7. 8. 9, 参照)

註: 表中の平均値はThompsonの棄却検定法により求め、*印は棄却の結果、4例平均であることを表し、()内は不偏分散を示す。総てR.A.Fischerの法、或はCochran & Cox氏近似法によつて有意の差を求めた。危険率は総て5%とした。

考 按

嫌気性条件自身では(但し約60分間)殆んど代謝に対して影響を与えない。然し照射を併用する時は、約15%の感受性の低下が認められる。

表1 酸素濃度の影響

動物 No.	20%		100%		0%	
	K ₁	X ₁	K ₂	X ₂	K ₃	X ₃
1	20.50	9.80	17.50	10.00	21.60	13.70
2	17.10	8.07	16.20	5.70	16.80	10.30
3	22.50	11.40	20.90	9.70	22.30	15.10
4	17.90	9.55	17.10	10.30	17.40	12.25
5	15.05	9.57	12.40	7.16	14.10	8.79
平均	18.61	9.67	16.82	8.57	18.44	12.03
各K ₁ ,K ₂ , K ₃ に対する%	(8.63)	(1.59)	(10.14)	(4.16)	(13.71)	(6.97)
K ₁ に対する%	100	51.9	100	50.9	100	65.2
K ₂ に対する%	100	51.9	90.3	46.0	99.0	64.6

表2 酸素濃度の影響
毎10分間値の平均 (各5例)

時間 (分)	20%		100%		0%	
	K ₁	X ₁	K ₂	X ₂	K ₃	X ₃
0~10	3.66 (0.44)	0.97 (0.87)	3.51 (0.76)	0.43* (0.01)	3.55 (0.43)	0.74 (0.15)
10~20	3.63 (1.06)	0.71 (0.16)	3.31 (0.31)	0.87 (0.16)	3.74 (0.61)	1.62* (0.15)
20~30	3.16 (0.50)	1.49 (0.20)	2.77 (0.50)	1.25 (0.20)	3.08 (0.67)	1.99 (0.35)
30~40	2.74 (0.47)	1.69 (0.10)	2.69 (0.75)	1.85 (0.17)	2.98 (0.33)	2.77 (0.19)
40~50	2.76 (0.30)	2.40 (0.18)	2.51* (0.06)	2.05 (0.46)	2.60 (0.54)	2.60 (0.44)
50~60	2.64 (0.23)	2.39 (0.99)	2.50* (0.06)	2.83* (0.57)	2.83* (0.08)	2.75 (0.34)

図1 酸素濃度の影響

図2 酸素濃度の影響

図3 酸素濃度の影響

表3 cysteine 併用

動物 No.	K	X	C	C + X
1	14.00	8.00	14.90	11.60
2	13.20	6.50	20.40	16.20
3	13.80	6.80	18.70	12.00
4	17.30	7.80	22.30	14.60
5	17.50	6.70	18.20	14.60
平均	15.16 (4.28)	7.16 (0.48)	18.90 (10.08)	13.14 (2.15)
K, C に対する%	100	47.2	100	69.5
K に対する%	100	47.2	124.6	86.6

表4 cysteine 併用
毎10分間値の平均 (各5例)

時間 (分)	K	X	C	C + X
0~10	2.47 (0.27)	0.66 (0.49)	3.06* (0.09)	0.65* (0.03)
10~20	2.79 (0.51)	0.30 (0.07)	3.47 (0.32)	1.47 (0.21)
20~30	2.53 (0.28)	0.68* (0.03)	3.15 (0.42)	2.51* (0.10)
30~40	2.22 (0.30)	1.56 (0.32)	2.97 (0.72)	2.54 (0.11)
40~50	2.35 (0.44)	2.04* (0.08)	3.12 (0.72)	2.96 (0.50)
50~60	1.71* (0.07)	2.03 (0.31)	2.84 (1.15)	2.90 (0.65)

図4 cysteine 併用

図5 cysteine 併用

図6 cysteine 併用

表5 NaCN 併用

動物 No.	K	X	CN	CN+X
1	16.40	8.35	21.80	4.10
2	15.90	9.50	27.20	4.90
3	14.80	11.10	23.30	3.70
4	19.60	9.60	23.00	4.30
5	17.60	6.90	20.20	5.60
平均	16.86 (3.36)	9.09 (2.37)	23.10 (6.99)	4.52 (0.55)
K, CN に対する%	100	53	100	19
Kに 対する%	100	53	137	26.8

表6 NaCN 併用
毎10分間値の平均 (各5例)

時間 (分)	K	X	CN	CN+X
0~10	2.98 * (0.23)	0.92 (0.13)	3.99 (0.42)	0.74 (0.18)
10~20	3.25 (0.22)	0.65 (0.36)	4.09 (1.56)	0.81 (0.17)
20~30	2.67 (0.37)	1.39 (0.29)	3.98 (0.18)	0.89* (0.01)
30~40	2.93 (0.15)	1.58 (0.16)	3.78* (0.01)	0.60 (0.14)
40~50	2.40 (0.27)	2.13 (0.24)	3.54 (0.22)	0.95* (0.04)
50~60	2.58 (0.51)	2.19 (0.20)	3.99 (0.10)	1.11 (0.23)

即ち無酸素による防禦効果が認められる。

純粹酸素条件自身により(但し約60分間)軽度低下し、照射を併用する時も対照(51.9%)に比し軽度の低下(46%)を認めるが、その差は有意でない。即ちDowdy⁵⁴⁾、Giles⁵⁵⁾が認めた如く酸素濃度が生理的条件以上の値をとる時は、酸素効果が明瞭でなくなるものと思われる。

図7 NaCN併用

る。

cysteine, NaCN は、夫々単独投与により代謝が高められる。従つてこれ等の化学的物質により、anoxia が齎されたものであるとしても100%窒素による嫌気的条件と同一の機転によるものとは考えられない。

chlmann⁵⁷⁾等は、吉田肉腫、Walkar 一癌、Jensen 肉腫の皮下腫瘍の切片について嫌気性代謝を指標として cysteine の防禦効果を認めているが、cysteine 単独投与の観察を行つてないから、cysteine の防禦機転の考察には適切でない。

cysteine をX線照射と併用して得られる著明な防禦効果には、SH 酵素群に及ぼす放射線の酸化作用に対してSH化合物が拮抗する放射化学的機転以外に代謝促進機転が関与していると思われる。

このことは還元作用を有する物質が必ずしも総て防禦効果を示さない事実によつて支持される^{25, 51, 52, 53)}。然し若し cysteine の方が単なる純粹酸素条件よりも組織内低酸素状態を容易にもたらし得るものとすれば、放射化学的にのみ解釈し得る余地が尚残されていることになる。

この点においてE. coli B の内因性基質の大部分を消費せしめた場合、放射線感受性が極めて

図8 NaCN併用

図9 NaCN 併用

低濃度の酸素によつても増強されることは、注目すべきことであると思われる⁵⁷⁾。

NaCNを併用する場合、著しい増感効果が認められ、cysteineの防禦効果と全く対蹠的である。呼吸毒の併用効果については、緒言において述べた如く、多数の研究者等が報告して居り³²⁻⁴⁸⁾、防禦効果が認められる場合には、酸素利用の阻碍される結果、恰かも窒素条件における照射と同義に解釈されて居り⁴⁸⁾、これに反し増感効果が認められる場合には、酸素利用の阻碍により、組織内酸素濃度が増加する結果、酸素効果が發揮されて、呼吸毒による増感効果を生ずるものとされている^{32, 42, 43, 58, 59)}。然し乍ら本実験においては純粋酸素条件下照射の場合の感受性は20%酸素条件下照射の場合に比し有意の増加を示さないことから、NaCN併用による増感効果は、単なる酸素濃度の増加によるものと思われない。

又 NaCNの生体内併用実験においてその防禦効果が照射前投与によつてのみ發揮されると云うことは、寧ろ生体内解毒機構に基因させることができるかも知れない。

酸素効果の実用的意義に関しては、Hermann⁶⁰⁾等が人間の皮下腫瘍について臨床的観察を行ない、その有効なことを報告して居る。

現在確認されている防禦物質、増感物質自身

は、大抵、実用的意義に乏しいが(cysteamineを除く)、将来における臨床的応用の発展に対して重要性を有するものと思われる。

結 論

吉田腹水肉腫細胞の嫌気性代謝に対して：

- 1) 酸素効果を認めたが、純粋酸素においては、この効果の増強が認められなかった。
- 2) cysteineの防禦効果、NaCNの増感効果が認められた。

(欄筆に当り、御指導、御校閲を賜つた戸部助教授に深甚の謝意を表すると共に御援助頂いた放射線科、松沢 秀夫博士、岡田峰利技師、他各位に深く感謝する。)(本論文の要旨は、昭和32年5月第16回日本医学放射線学会総会で発表した。)

文 献

- 1) O. Risse : Str. ther. 34 : 578~581, 1929.
- 2) H. Fricke, S. Morse : Phil. Mag. 7 : 129~141, 1929.
- 3) H. Fricke : J. Chem. Phys. 2 : 556, 1934.
- 4) H. Fricke : J. Chem. Phys. 3 : 364, 1935.
- 5) H. Fricke, E.J. Hart : J. Chem. Phys. 3 : 596, 1935.
- 6) H. Fricke, E.J. Hart, H.P. Smith : J. Chem.

- Phys. 6 : 229~240, 1938.
- 7) W.M. Dale : Biochem. J. 34 : 1367~1373, 1940.
 - 8) W.M. Dale : Biochem. J. 36 : 80~85, 1942.
 - 9) W.M. Dale : Brit. J. Radiol. 16 : 171~172, 1945
 - 10) J. Weiss : Nature, 153 : 748~750, 1944.
 - 11) F.S. Dainton : Nature, 160 : 268~269, 1947.
 - 12) H. Holthusen : Arch. Ges. Physiol (Pflügers) 187 : 51, 1921.
 - 13) H.G. Crabtree, W. Cramer : Proc. Roy. Soc. London. 113 : 238~250, 1933.
 - 14) J.M. Thoday, J. Read : Nature 160 : 608, 1947.
 - 15) J.M. Thoday, J. Read : Nature 163 : 133~134, 1949.
 - 16) J. Read : Sixth Intern. Congr. Radiology. London, abstracts of Papers, 50, 1950.
 - 17) E.S.G. Barron等 : J. Gen. Physiol. 32 : 537~552, 1949.
 - 18) H.M. Patt等 : Pro Soc. Exptl. Biol. Med. 73 : 18~21, 1950.
 - 19) W.H. Chapman等 : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 75 : 318~332, 1950.
 - 20) W.H. Chapman等 : Radiology. 55 : 865~873, 1950.
 - 21) H.M. Patt等 : Science. 110 : 213~214, 1949.
 - 22) H.M. Patt等 : Am. J. Physiol. 163 : 740, 1950.
 - 23) H.M. Patt等 : Blood, 5 : 758~763, 1950.
 - 24) D.E. Smith等 : USAEC Report ANL-4401. 72 : 1950.
 - 25) D.E. Smith等 : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 73 : 198~200, 1950.
 - 26) E.S.G. Barron : Symposium on Radiobiology, NewYork, wiley. 216, 1952.
 - 27) A. Hollaender : Symposium on Radiobiology, NewYork, wiley. 285, 1952.
 - 28) A. Hollaender等 : Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 16 : 315, 1951.
 - 29) A. Hollaender等 : Nature, London, 167 : 103, 1951.
 - 30) L.H. Gray : Brit. J. Radiol. 26 : 609, 1953.
 - 31) L.H. Gray等 : Brit. J. Radiol. 26 : 638, 1953.
 - 32) H.G. Crabtree. W. Cramer : Proc. Ray. Soc. 113 : 238, 1933.
 - 33) H.G. Crabtree. W. Cramer : Sci. Pep. Imp. Cancer Res. Fund. 11 : 103, 1934.
 - 34) J.C. Mottram : Brit J. Radiol. 8 : 32, 1935.
 - 35) F.D' Amato, A. Gustafsson : Hereditas. 34 : 181, 1948.
 - 36) A.H. Dawdy等 : Nuclear Sci. Abstr. 4 : 2121, 1950.
 - 37) Z.M. Bacq. A. Herve等 : Science, 111 : 356, 1950.
 - 38) H. Betz. A. Herve : C.R. Soc. Biol. 144 : 1015, 1950.
 - 39) D.E. Smith等 : Nucl. Sci. Abstr. 5 : 2032, 1951.
 - 40) Z.M. Bacq. A. Herve : Brit. J. Radiol. 24 : 617, 1951.
 - 41) Z.M. Bacq. A. Herve : Arch. int. Physiol. 59 : 348, 1951.
 - 42) B.V. Hall : Argonne Nat. Lab. ANL-4401. 130 : 1951.
 - 43) A. Hollaender等 : J. Bact. 63 : 591~595, 1952.
 - 44) R.B. Jr. Meffred, T.S. Matney : Science. 115 : 116, 1952.
 - 45) Z.M. Bacq等 : Acta Radiol. 38 : 489, 1952.
 - 46) J. Read : Ann. Rep. Brit. Emp. Camer Campgn. 31 : 319, 1954.
 - 47) K. Mikaelson : Proc. Nat. Acad. Sci. 40 : 171, 1954.
 - 48) H. Lase. : Nature. Lond. 174 : 753, 1954.
 - 49) P. Alexander. : Z.M. Bacq Rad res, 2, 4 : 392~415, 1955.
 - 50) W. Lorenz : Fortschr. Rentgen stra 44 : 1952.
 - 51) H.M. Patt等 : USAEC Report ANL-4625, 1951.
 - 52) 戸部竜夫 : 日放医誌, 15 : 949~964, 1955.
 - 53) 戸部竜夫 : 日放医誌, 15 : 1119~1123, 1955.
 - 54) A.H. Dowdy : Radiology, 55 : 879, 1950.
 - 55) N.H. Jr. Giles, A.V. Beatty : Science, 112 : 643~645, 1950.
 - 56) G. Uhlmann等 : Str. ther, Sander bande 35 : 174~176, 1956.
 - 57) Alper:Aciba Foundation Symposium, Ionizing

- Radiations and Cell metabolism, 116, 1956.
- 58) A. Hollaender等: J. Bact, 63, 805~811, 1952.
- 59) Z.M. Bacq: Grundlagen d. Strahlen biologie, 293, 1954.
- 60) Hermann等: Str. ther, 102: 3542, 1957.

AN INVESTIGATION ON THE CHEMICAL PROTECTING MECHANISM AGAINST X-RAY IRRADIATION

Takuro Nishino: Department of Radiology, School of Medicine, Gunma University.
(Director: Asst. Prof. T. Tobe)

It is possible that the respiratory poisons, especially cyanides, give some clue to the elucidation of the "oxygen effect", which has been investigated in relation to the chemical protecting mechanism against X-ray irradiation. Some of the SH-compounds, on the other hand, are known to show the protecting effect, of which, however, it is not known whether their reducing power is the only explanation for it.

In these contexts, rates of the anaerobic glycolysis, which is known as one of the most sensitive metabolic activity to X-ray irradiation, of the Yoshida sarcoma cells were measured after their incubation under the following 3 sets of conditions, where the experimental groups were irradiated, each control experiment without irradiation being run at the same time. 1. In 0%, 20% and 100% oxygen, respectively. 2. with cystein, $6.7 \times 10^{-2}M$. 3. with NaCN, $1.63 \times 10^{-3}M$. The activities were measured after incubation by the routine Warburg's technique, with the following results:

Anaerobic incubation, in itself, had no effect on the glycolytic activity. It lowered, however, the inhibiting action of X-ray by 15% compared with the aerobically incubated cells, thus showing a protecting effect. Incubation with 100% O_2 had no effect. It seems that unphysiologically high O_2 pressure obscures the oxygen effect.

Cystein and NaCN were similar each other in stimulating the glycolytic activity. They showed, however, contrasting results when the cells were irradiated. The former increased X-ray inhibition by 39% (sensitization), the cyanide, on the other hand, depressed it by 27% (protection). The anoxic condition, which might be brought about by these compounds, must be different from the true anoxia in anaerobiosis. Their effects are to be interpreted in the other terms of the radio- and biochemistry.