生体内トリチウム水と組織結合性トリチウムの分別測定法とそれによる *Artemia salina* のトリチウム水取込みの測定†

樋口昌孝, 百足彰子*, 太田正市

東北大学医学部放射性同位元素中央実験室(仙台市星陵町),

*東北大学農学部海洋学研究室(仙台市雨宮町)

1974年 3月22日 受理

1. はじめに

^3H - β 線はそのエネルギー(最大エネルギー, 18 keV)が非常に低く, 生体内での最大飛程も $7\mu\text{m}$ に過ぎない¹⁾。したがって, ^3H の生物学的効果は, 生体内での存在部位や生体内での存在状態によって著しい違いがあると推定される。トリチウム水(THO)が生体に取り込まれると, ^3H が交換反応や生化学的反應によって, 速やかに生体構成有機物の構成水素となることは周知のとおりである。われわれは THO の生物学的効果, 生体内での挙動を解析する第一歩として, 生体内で水分子として存在する THO と, 有機物に結合した ^3H を分別測定することの必要性を感じ, 凍結乾燥法により, 少量の試料に含まれる THO と生体内有機物に結合した ^3H を定量的に分別し, 液体シンチレーションカウンタで測定する方法を考案し, その装置を試作した。そして, これを用いて, THO 汚染海水に動物プランクトン *Artemia salina* をおいたとき, 環境水の THO が, どのような時間的経過で生体内 THO および組織結合性 ^3H に変わるかを調べる実験を行なった。

2. 装 置

装置の概略を Fig. 1 に示す。パイレックスガラス製

Fig. 1 Apparatus for trapping THO from living matter.

凍結乾燥用試料びん(内径3.0cm, 高さ12~24cm**) Aは, 真空に保てるよう, ゴムのパッキングのついた蓋 A' で固定できる。蓋 A' には石英製パネ秤が着脱できる。パネ秤の伸長は鉛直距離測定用目盛付遊動望遠鏡で, 約1.8mの距離から測定した。パネ秤は20~200mg 間では, 試料重量に比例して伸長した。ガラスびんB(内径3.0cm, 高さ12cm)もパイレックスガラス製で, 微量の水を遠心によって, 集められるよう, コニカル遠心チューブにした。これもパッキング付蓋 B' に固定した。蓋 B' には, コック1を介して, びんAに通じる管1と真空ポンプに通じる管3を取りつけた。管2は着脱できるよう, ねじ込み式にした。びんBには内部の冷却効率をよくし, また水蒸気との接触面積を大にするため, ジグザグに折り曲げた銅ハクを入れた。冷却には, 300ml 容量デュワーびんにはいった液体窒素を, 真空には, 油拡散ポンプ付真空ポンプ(大亜真空, VFD 510SS 型)を用いた。

3. 操 作

まず, コック1を閉じ, 蓋 B' に管2と銅ハクを入れた遠心管Bを取りつけ, 密栓する。つぎに, コック2を開いて, ポンプで排気してから, 遠心管Bを冷却する。一方, 試料びんAの蓋 A' にパネ秤を取りつけ, その下端に50~150mgの試料をのせ, 手早くびん

† Method for Differential Estimation of Tritiated Water (THO) and Bound Form Tritium in Organisms. Masataka HIGUCHI, Akiko MUKADE*, Masaichi OOTA: Laboratory for Radioisotopic Research, School of Medicine, Tohoku University, Seiryō-cho, Sendai, * Faculty of Agriculture, Tohoku University.

** 試料が多くて, パネ秤が底につかえるときには適当に長いびんを用いる。

Table 1 Recovery of THO by use of the apparatus

Exp. No.	Weight of dried <i>Artemia</i> (mg)	Addition of THO		Time of lyophilization (min)	Radioactivity of recovered THO (μCi)	Recovery (%)
		μCi	μl			
1	15.8	0.540	50	220	0.545	100.1
2	20.0	0.324	30	120	0.269	83.0
3	10.0	1.08	100	120	0.946	87.6
4*	15.0	1.08	100	80	1.008	93.2

Dried tissues of *A. salina* were adsorbed with THO ($10.8\mu\text{Ci/ml}$), and then the THO was recovered by lyophilization as described in text.

* The lyophilization was carried out at room temperature (15°) for 60 minutes and subsequently by warming at 24° for 20 minutes under an infrared lamp.

Aをかぶせて密栓する。この状態でバネ秤の伸長を読み取り、びんAは冷却試料を凍結してから、コック1を開き、AB面を開通して、乾燥を開始する。ときどきバネ秤の伸長の変化を観測し、重量変化がほとんど認められなくなるまで、乾燥を続ける。

乾燥が終わったら、まずコック2を閉じて、冷却を止め、コック3を静かに開いて、乾燥した空気を入れる。A, B両容器内の気圧が常圧に戻っても、しばらくそのまま放置し*, びんBの温度が常温近くまで上昇するのを待つ。そして、びんBと管2を手早く蓋から外し、管2、銅ハクを入れたままゴム栓をし、約1,000gで2分間遠心し、回収されたTHOを全部びんの底に集める。銅ハク、管2を取り除き、THO一定量の蒸留水で希釈、一部を液体シンチレーションカウンタで ^3H の放射能を測定する。

組織に結合した ^3H は、凍結乾燥組織をトリチウム燃焼装置²⁾で燃焼、THOとして回収し、液体シンチレーションカウンタで、放射能を測定する。

4. 予備実験

Fig. 2は、15.8mgの凍結乾燥アルテミアに、 $50\mu\text{l}$ のTHOを浸み込ませた試料を凍結乾燥した場合の、重量変化の時間経過を示す。1時間で約80%, 2時間で約90%, 3時間でほぼ完全に乾燥したことがわかる。実際、この場合、得られたTHO放射能から、添加THOの回収率を計算しても、ほぼ100%であった(Table 1, Exp. 1)。凍結乾燥アルテミアに既知量のTHOを吸収させ、乾燥時間や条件を変えて、THOの回収率を比較した(Table 1)。添加THO 30, 100 μl で2時間室温乾燥では、回収率はそれぞれ83, 88%であったが、乾燥開始1時間後に、200ワット赤外線ランプで照射し、びんAの外部温度を $20\sim 30^\circ\text{C}$ に保って、さらに20分間乾燥を続けると、回収率が93%に

Fig. 2 Time course of lyophilization of THO adsorbed by dried tissues of *Artemia salina*. Lyophilized tissues of *A. salina* adsorbed with $50\mu\text{l}$ THO ($10.8\mu\text{Ci/ml}$) were lyophilized again by the method described in text.

上がった。このように、温度を高くすると、短時間でよい回収率を得ることができる**。

5. 組織内 THO 区分に混入してくる組織外 THO 量の推定法

アルテミアのような水生小動物や微生物をTHOを含む溶液や培養液に入れ、一定時間後に口過または遠心によって、外液と分離してから、その体内のTHOを測定する場合には、生物体表面に付着したTHOや、消化管内に存在するTHOも、凍結乾燥によって得られるTHO区分に混入してくることは避けられない。したがって、組織内THO量を正確に評価するには、組織外THOの混入率を正しく評価する必要がある。この目的に、 ^{14}C -イヌリン法³⁾が応用できる。イ

* 低温のまま、Bの蓋を外すと、空気中の水蒸気が管内で凝結して、湿度が高い場合には誤差を大にするおそれがある。

** 試料を凍結しないで、最初から加温すれば、乾燥に要する時間はもっと短縮することが可能かもしれないが、湿った試料を加温すれば、 $\text{THO} \rightarrow ^3\text{H}$ 結合性への反応が促進されるおそれがある。

ヌリンは細胞に透過し難い水溶性多糖体としてよく知られている。いま、 ^{14}C -イヌリンを含む THO 溶液にアルテミアを入れ、一定時間後に取り出したアルテミアを凍結乾燥後、乾燥組織を ^3H 、 ^{14}C -燃焼装置で燃焼し、 ^{14}C -イヌリンを $^{14}\text{CO}_2$ とし、その放射能を測定する。組織内 THO 区分に混入した体外 THO の量 $X\text{dpm}$ はつぎの計算によって算定できる。

$$X = A \times \frac{b}{B}$$

なお、 A : 外液の THO の放射能濃度 (dpm/ml)

B : 外液に含まれる ^{14}C -イヌリンの放射能濃度 (dpm/ml)

b : 凍結乾燥組織に含まれた ^{14}C の全放射能 (dpm)

アルテミアを ^{14}C -イヌリン含有 THO 海水に入れ、一定時間ごとに取り出し、上記の方法で組織内 THO 区分の外液 THO の混入率を求めると、10~30% という値が得られた。

なお、長時間 ^{14}C -イヌリン含有海水中においたアルテミアでは、短時間のものより、組織の ^{14}C の量が高くなる傾向が認められた。このことは、 ^{14}C -イヌリンがわずかずつ、アルテミア組織に吸収されるのか、消化管内でイヌリンが、集積するのか、その原因は明らかでないが、この方法により混入率を求めるには、もっと詳しい検討が必要である。

6. アルテミア組織への THO の取込み

Fig. 3 は THO を含まない海水で飼育したアルテミア成体を、THO 海水に入れ、一定時間ごとに取り出

Fig. 3 Kinetics of incorporation of tritium from seawater-THO into *A. salina*. Adults of *A. salina* were incubated in seawater containing $1\mu\text{Ci/ml}$ THO at 24°C . 7-18 mg of the organisms were collected and lyophilized by the method described in text.

—△—: Exp. 1. —○—: Exp. 2.
—+—: Exp. 3.

し、上述の方法で組織内 THO と組織結合性 ^3H の放射能濃度を測定し、それぞれの比放射能 (dpm/H 原子) を外液の水の比放射能と比較した結果である。実験ごとの変動が大きい、アルテミア組織内の水が外界の水と同じ比放射能になるには、8~30時間を要した。一方、組織構成水素化合物と THO が交換反応や生化学的反応を通じて、組織結合性 ^3H となる反応も、それらの水素が ^3H で飽和され、外界 THO との間に平衡が成立するまで、約20時間あまりを要した。しかし、この場合、結合性 ^3H の比放射能は外界の水の比放射能の50%足らずのレベルに過ぎず、それ以上は、トリチウム化はほとんど進行しないようにみえる。

7. 考 察

凍結乾燥法により、体液の水分子と組織構成水素化合物に含まれる ^3H を分別定量することは、これまで、THO 汚染環境で生存する動物体内の ^3H 濃度を測定する場合^{4)~6)}等に用いられてきた。しかし、ふつうの凍結乾燥装置は試料の乾燥を目的として製作されており、試料に含まれた水の定量的回収には、必ずしも適当ではない。われわれの考案した装置はこの点に改良を加え、少量の試料 (20~200mg) を凍結乾燥するとともに、その試料に含まれる水を定量的に捕捉、回収することができた。

また、複数の装置を1つの真空ポンプに対して、並列的に取りつけることにより、同時に多数の試料を処理することも可能である。凍結乾燥の終了を確認するため、バネ秤を使用した、はじめに、バネ秤法で乾燥終了までに要する時間を測定しておけば、以後は初回とはほぼ同量、同種類の試料を、同条件で凍結乾燥する限り、毎回、バネ秤を使用しなくても一定の結果を得ることができる。

一般に水は細胞を自由に透過できるものと考えられるので、生体に THO を与えた場合、それは速やかに組織内の水と交換し、体内外の水の THO 濃度は短時間で平衡に達するものと予想したが、アルテミアでは、8~30時間という長時間を要したのは意外であった。しかも、組織内の水の THO 濃度の増加と、組織結合性 ^3H の増加が、大体平行していること (Fig. 3) も興味深い。この現象がアルテミアだけに認められる特殊なのか、それとも、他の生物にも共通して認められる現象なのか、いまのところ明らかでない。

本研究の遂行に当っては文部省科学研究費の援助を

受けた。

文 献

- 1) Oliver, R.: Biological Effects of Transmutation and Decay of Incorporated Radioisotopes, p.165, International Atomic Energy Agency, Vienna (1968)
 - 2) 樋口昌孝, 太田正市, 百足彰子: *Radioisotopes*, 投稿中
 - 3) Fujimoto, M., Higaki, K.: 日本生理学雑誌, **32**, 329 (1970)
 - 4) Evans, G.A.: *Health Phys.*, **16**, 57 (1969)
 - 5) Siri, W.E., Evers, J.: Tritium in the Physical and Biological Sciences, **2**, p.71, IAEA, Vienna (1962)
 - 6) Bogen, D.C., Henkel, C.A., White, C.G.L., Welford, G.A.: *J. Radioanal. Chem.*, **13**, 335 (1973)
-