放射線障害回復促進物質†

武田篤彦, 米沢司郎, 加藤智雄

大阪府立放射線中央研究所

593 堺市新家町704

1. はじめに

われわれはここ3, 4年前から, 薬用ニンジンから得た抽出物を亜致死量線のX線を照射したマウス(ハツカネズミ)に投与すると, その死亡率がかなり減少することを見出して, その有効成分の精製と作用機構の解明をめざしている。

放射線障害の回復促進に関しては, 多くの研究が精力的にすすめられてきたものの, 照射後に投与して回復を促進させる物質の探求は数少ないようにみられる。

そこで, この機会に, 照射を受けた個体の回復促進にかかわる知見を多少なりとも集めて, 全体像をつかむ一助にしたいと考えた。本文は, 障害と回復の関係, わが国での組織的研究を含むいくつかの回復促進物質の紹介, および, われわれの研究経過の概要の紹介の4部から構成した。

これを機会に, この分野に興味を持たれるかたが増え, また, いろいろとお教えいただけることを希望する。

2. 放射線障害とその回復の関係

2.1 放射線障害の防護

生物に放射線を照射したときのもっとも大きい特色は, 放射線エネルギーが, 生体を構成するすべての物質に無差別に吸収されるということであろう。そして, その結果としての正常な状態からの変化が“障害”(injury)であり, 一般に生物に対して放射線照射を行う場合には, 分子レベルから個体レベルまでの, いろいろな段階と経過をもった障害が考えられる。

これに対応して, これらの放射線障害をもたらしないうようなてだてを“防護”(protection)といい, 温度, 含水率, 酸素濃度やさまざまな化合物など, 物理的条件や化学物質のはたらきによって, 照射による影響を軽減することを期待するものである。

そして, 放射線の照射前に処置されなければ有効でない場合を, 狭い意味での“防護”, 照射後に処置しても照射効果を軽減させうる場合を“回復”とよんでこれらを区別している。

2.2 障害からの回復の区分

“回復”という概念は, recovery, repair, rescue, recuperation, sparing, repopulation, renewal など, さまざまな単語で表現され, 十年以上も前からその混乱が指摘され, 今日, だいたい整理されたとはいえ, なお問題がないわけではない。

江上¹⁾によれば, “回復”(recovery)とは, 放射線エネルギーによって生じた「障害を正常な状態にもどす逆反応をおこそうとする能力」であり, 当然, 分子から個体までの, いろいろなレベルではたらくと考えてよい。そして, それは便宜的に(1)細胞レベルでの回復(intracellular recovery), (2)細胞集団や組織以上のレベルでの回復(intercellular recovery)の2つに区分できる。

2.2.1 細胞レベルでの回復

ファージや大腸菌をはじめとして, いろいろな微生物あるいは高等動物, とくに哺乳類の培養細胞を用いて, 主としてその増殖能力や生残率を指標として, 回復現象の解明が試みられてきた。

1950年代後半から紫外線照射された大腸菌など微生物について, 回復能力のいちじるしく異なる変異株の特徴を利用した実験がとりわけ精力的にすすめられ, その結果, DNA分子に生じた障害は, 酵素反応によって回復することが知られた。

† Substances Stimulating Recovery for Radiation Injury. Atsuhiko TAKEDA, Morio YONEZAWA and Norio KATO: Division of Medicine and Hygiene, Radiation Center of Osaka Prefecture, Shinke-cho 704, Sakai 593.

この現象はDNAの“修復”(repair)とよばれるもので、その反応の様式から、塩基の除去修復、ポリメラーゼ修復、組み換え修復などと区別されている。この問題については、repair という用語より rescue のほうが適切であるという意見もある。

また、哺乳類細胞の培養技術の急速な進歩にともなう、照射後の適当な条件下ではDNA修復のほか、障害をうけた染色体に“再結合”(rejoining)をはじめとする復旧が行われることを利用して、培養細胞を材料に増殖能力の回復を検討する実験がすすめられ、細胞に生じた“亜致死の損傷”(sublethal damage)からの回復機構の解明など、いろいろな観点からの多数のすぐれた業績が報告されている。とくに、チャイニーズ・ハムスター細胞を用いて、分割照射の手法をたくみに利用し、回復過程に要する時間を求めたElkindら^{2),3)}の研究は有名である。

2・2・2 細胞集団や組織以上のレベルでの回復

照射された組織で“致死の損傷”(lethal damage)をうけた細胞がはこび去られたような場合、そのあとに残っていた“幹細胞”(stem cell)が細胞分裂を再開して、新しい細胞が増殖してくることによる回復である。つまり“細胞再生系”(cell renewal system)における回復であり、この場合は、細胞数の減少ののち細胞分裂によって補充されるかたちの回復である。この回復には、また、幹細胞自体についての“細胞レベルでの回復”が関係している。

2・3 個体レベルでの回復が問題とされる障害

個体が放射線照射される場合には、放射線源との位置関係によって、これを2つに区分することが行われている。線源がからだの外部にある場合には、外部線源であり、照射による被曝の様式は体外被曝ということになる。これに対して、線源がからだの内部に存在している場合は内部線源であり、それは体内被曝をもたらすことになる。

外部線源の例としては、各種放射線発生装置や⁶⁰Co γ線照射装置のように密封された放射性同位元素があり、気体、液体あるいは粉末状態で体内に摂取された。密封されていない放射性同位元素などは、内部線源としての役割をはたすことになる。

回復をとりあつかう場合は、そのほとんどは外部線源による体外被曝にかぎられているのが現状である。

さて、放射線の遺伝的影響は別として、身体的な障害を問題とする立場から個体の被曝をとりあつかう場

合には、照射効果の指標として、生死の判定が用いられることが多い。

一般に、個体への照射後30日目における死亡率が100%であるような線量を100%致死線量(LD₁₀₀)、50%の場合を50%致死線量(LD₅₀)とよんでいる。ヒトについては、それぞれ700R、400R程度と推定されている。

LD₁₀₀あるいはそれ以上の線量を照射された場合、そのおもな死因となる障害は、線量にもなっていることが知られており、それらは表1に示すとおりである。

表1 急性放射線死

名 称	線 量 (R)	死亡の時期	死亡の主因・症状など
骨髓死	~10 ³	5日目より始まり10—14日目が最多	造血臓器の障害。骨髓の荒廃、白血球や血小板をはじめ各種血球減少症、出血など。
胃腸死	10 ³ ~10 ⁴	3.5~5日	小腸粘膜の破壊による栄養物、水分の吸収不良、出血や体内電解質・水分の脱出による脱水症状と栄養失調、腸内細菌の侵入による細菌感染。
中枢神経死	10 ⁴ ~	数時間程度	中枢神経系の混乱によるもので、興奮、悪心、眼球振とう、異常反射、意識不明。

したがって、LD₁₀₀にちかい線量による致命的な障害は骨髓死をまねくもので、主として骨髓系の造血組織の障害と、これに対する回復のバランスによって決定されるものと考えられる。

また、放射線障害は、照射直後から数週間以内に照射効果が発現してくるような急性障害と、照射後数年あるいは数十年という長い期間の経過ののちに発症をみるような晩発性障害とに区別してとりあつかわれている。造血臓器の障害やそれともなう血液像の変化、生殖腺や消化管の損傷などが前者であり、後者には、白血病や皮膚がんなどの発がん、白内障の発生や寿命の短縮などがあげられる。回復をめぐる問題のほとんどは、これらのうち急性障害を研究対象にしたものである。

2・4 個体レベルでの回復の特徴

高等動物の個体が放射線に被曝した場合には、一般の損傷とはちがって、構成する組織臓器は、程度の差こそあれ同時に損傷をうけていることになる。そしてそれぞれの組織臓器の回復には、それを構成する細胞の回復および細胞間における回復などにもとづく、それ自体としての回復能力の程度が重要であり、しかもその経過は、同時に損傷された他の組織臓器の状況によって大きく影響され、結果も異なったものになると考えられる。

もちろん、照射された放射線の線質、線量、線量率、照射回数、照射間隔、照射部位をはじめ、個体の年齢や酸素分圧や温度などの生理的条件といった多くの要因が障害の程度を変え、複雑なものにするので、回復のパターンも多様なものになってくる。

たとえば、亜致死的損傷を与える線量を照射する場合、総線量が同じでも、1回に照射するよりも休止期間をはさんだ分割照射の場合のほうが、個体に対する急性障害は軽減されることが知られている。これは、分割照射の場合、第1回目の照射による損傷が休止期間中に回復することを示すもので、その時間間隔を長短いろいろにとることによって、回復過程の解析が、ある程度は可能である。

ここでは、外部線源による全身1回照射により、骨髓死をひきおこすような線量を被曝したマウスなどの個体に、照射後に投与して照射効果を減少させ、回復を促進させ得るような物質について、今日までに報告されている数多くの知見のなかから、いくつかを紹介する。

以下の記述が示すように、現在までのところ、ヒトに応用できる段階にまで研究のすすめられた放射線障害回復促進物質は、残念ながらまだ得られていないのである。

3. わが国で行われた組織的研究

わが国においては、1960年代後半に、放射線障害の回復に関する組織的な研究が行われた。放射線医学総合研究所・特別研究「放射線障害の回復に関する調査研究」(昭和41~43年度)⁴⁾と、日本アイソトープ協会が、原子力平和利用委託費によって実施した「放射線障害回復促進物質に関する研究」(昭和44~46年度)⁵⁾である。

前者は、放射線の作用効果についての知見が得られるにつれ、それら各分野の研究成果の関連性について

の解明をすすめるにあたっては、分子から個体までの各レベルでの回復現象の有無や、回復過程などについて、組織的な検討を行う必要があるとして、放射線医学総合研究所の機構をあげて共同研究体制を実施したものであり、後者は、そのあとをうけて、とくに回復促進物質に焦点をしばって、大学の研究陣が回復過程についての最近の知見をもとにして、放射線障害の薬物的治療法の基礎資料を得ることを目的に、テーマを分担して協力体制をつくって行われたものである。

このようにして行われた共同研究は、いろいろな意味で特記すべきことがらであるとおもわれるので、それらの研究結果の関係する部分を、簡単に紹介する。

3・1 放射線障害の回復に関する調査研究

昭和41年度から3年間、江上信雄生物研究部長を班長に、15~16名の班員で実施された。

平嶋は、血液幹細胞の動態について、 C_5H/He 系マウスにX線500R照射直後、瀉血(体重の2%量)の処置や、エリスロポエチン、腸チフス・パラチフスワクチン、緬羊赤血球浮遊液、bovine- γ -globulin、complete Freund adjuvant および zymosan の注射が、骨髓の幹細胞の ^{59}Fe とりこみや脾臓でのコロニー形成を高めるなど、回復の促進効果をあらわすことを知った。また、墨汁貪食係数 granulopoietic index を求める方法で試験したところ、これら効果をあらわしたものの多くに網内系機能の亢進がみとめられたという。そして、出血やエリスロポエチンなどは erythropoietin responsive cell に、腸チフス・パラチフスワクチンなどは leukopoietin responsive cell に、また、緬羊赤血球浮遊液などは抗原刺激として antigen responsive cell に、それぞれはたいてこれらの分化をうながすことにより、幹細胞の増殖を促進するものと考え、これには網内系機能が大きく関連するとしている。

中村らは、マウスにLD₁₀₀近傍のX線全身照射することによって生じた血小板数の減少、糞便潜血反応の陽転、血液水分量の増加、飲水量・糞便量・尿量・体重などの減少および皮膚温度の低下などの結果に加えて、解剖所見から、出血傾向が増大するとの知見を得た。そして、照射後の一定時期に頻回くりかえす血小板(栓球)輸血により生残率が高まることから、このように外部から血小板を補給することによって、照射後に残存している幹細胞が増殖分化して血小板を産生してくるまでの、血小板減少による出血などの危機的時期を突破することができ、やがて自らの血小板の

出現により個体の回復が可能になると考えた。そして、この考えの発展として、抗血小板血清を投与することにより血小板造血系を刺激し、同様の効果を期待できるとして、5-hydroxytryptophan (5-HTP) や墨汁投与など、広く一般的に放射線感受性をさげる効果のある薬剤や処置は、血小板造血系を刺激することにより放射線感受性の高いこの系の細胞や幹細胞の、質的、量的変化をもたらすと考えた。

篠田は、ddY 系マウスにX線を700または800R照射前後に各種薬剤を腹腔内投与して、30日目の死亡率から防護効力の算出と、その有意性の検討を行った。(1)含イオウ化合物—MEAをはじめ6種類について、回復効力は認められなかった。(2)ビタミン類—多くのビタミン類(26種類)のうち、ビタミンEの誘導体に回復効力を示すものがあった。(3)ホルモン類—副腎皮質ホルモン、男性ホルモン、卵胞ホルモン、黄体ホルモンなど14種類について試みたが、回復効果は認められなかった。(4)核酸関連物質—核酸塩基, nucleoside, nucleotide など25種類について検討したが、inosine のみが照射前または後投与で、いずれも有効であった。(5)抗生物質—消化管粘膜の放射線損傷による細菌感染症を考慮して、tetracycline ほか9種類について試みたが、dihydrostreptomycin と、これと streptomycin の等量混合物にのみ、回復効果が認められた。

色田らは、生体からの抽出物について検討を加えた。すなわち、ddY 系マウスの脾臓を凍結・粉碎し、0.9% NaCl 中で溶解してからろ過して得た cell free extract を、Sephadex G-200 イオン交換カラムにのせて分取したろ液を、便宜的に5つの画分にわけた。また、同系のマウスに腸チブス・パラチフスワクチンを腹腔内投与してのち摘出した脾臓を、同様に処理して5つの画分をつくった。この両者について、600R のX線全身照射された同系マウスの生存日数に対する効果をしらべた。方法としては、照射後5分から96時間までの間に5回、これらの画分をそれぞれ1回に1ml左背部皮下に注射し、30日後の生存日数を求めた。結果は、画分Ⅳに危険率5%で有意の生存延長を認めたが、画分自体については正常マウスとワクチン投与マウスの間で差はなかった。また、この一連の実験をくりかえしたところ、再現性はなかった。

3.2 放射線障害回復促進物質に関する研究

菅原努教授(京大・医)を中心に6名の分担で、昭

和44年から3年間にわたって実施された。

近藤は、5'-nucleoside または nucleotide をX線照射後の大腸菌の培養液に加え、生存率に対する効果をしらべたが無効であった。

培養哺乳類細胞のコロニー形成能を指標にして、100~700R照射後の生存率についての核酸先駆物質の回復促進効果が、堀川によってしらべられた。混合物を含む8種類の物質のうち、adenosine, adenine および4種の deoxyribonucleoside の等量混合物に、ある程度の効果が認められた。

河村は、マウス腹腔内のエールリッヒ腹水がん細胞に500R照射5時間後に注射した、核酸およびその関連物質10種について、染色体切断の頻度の比を指標として回復促進効果をしらべたところ、Nucleton と d-GMP の投与が効果をあらわすことを知った。Nucleton は酵母 RNA のアルカリ加水分解物で、おもに4種の ribonucleotide からなっている。

個体レベルでの検定に、江上はメダカの生存率を指標として用いた。すなわち、X線の1.5~4 krad を照射したメダカに Nucleton や核酸先駆物質を腹腔内注射して、30日または60日生存率を比較した。その結果、Nucleton あるいは adenosine の照射後24時間以内投与が有効であることを知ったが、その値は、実験群ごとにかなりバラついている。

土屋、河村、菅原の3グループが、別個に ddY 系マウスを用いて、照射後、Nucleton, adenosine および両者の混合物を投与して半数致死線量 LD₅₀ を求めて比較したところ、これらはすべて生残を高める効果のあることがわかった。また、700~1,000R照射された同系マウスに対して投与された8種類の核酸先駆物質のなかで、adenosine がもっとも有効であり、しかも照射後毎日1回、合計5回以上の連続投与が効果を高めるという結果を得た。

これらの結果から、adenosine と Nucleton を放射線障害回復促進物質と結論して、これらによる効果は、細胞増殖の調節機構に関係しているものであらうと考えた。

4. 最近報告されているいくつかの回復促進物質

個体の放射線障害を回復させる試みはすこぶる多く、それらを細大漏らさずに述べることは著者の能力をはるかにこえていて、既刊のすぐれた成書⁹⁾を参照していただくのが適当である。ここでは代表的ないく

つかの例をとりあげて、それぞれの要点を説明したい。

4.1 遊離基の scavenger

放射線照射を受けた場合、水ラジカル ($H\cdot$, $OH\cdot$, 水と電子) の半減期がたいへん短いために、照射後に投与してこれらのラジカルと反応させたり分解させることはむずかしい。いくつかの試みにもかかわらず、システインを代表とする SH 化合物では、照射前投与では有効でも、照射後投与では無効である⁶⁾。

ところで、最近ウシから得た superoxide dismutase が照射後投与で骨髓細胞の生残率を高め⁷⁾、マウスの死を防ぐ⁸⁾ことが知られた。この酵素は水ラジカルと酸素分子との反応によって生じた superoxide radical の分解反応、

を促進するために放射線死を防ぐと考えられている。今後の進展に注目したい。

4.2 inert substance

墨粒子^{9), 10)}やガラス粉末¹¹⁾のように、微粒子状の、化学的に inert (不活性) な物質の投与で放射線死が減少することが知られている。墨粒子の場合には、網内系 (reticuloendothelial system) の閉そくによるメカニズムが森らによって明らかにされた¹²⁾。実用に供するにあたっての問題点は、これらの物質の体内からの排出がきわめて遅いことであろう。

4.3 菌体内毒素

Salmonella typhosa, *E. coli*, *Proteus morganii* などのグラム陰性菌の菌体内毒素 (endotoxin) が照射の前または後に投与して有効なことが知られている⁶⁾。照射後の感染症を低下させることから非特異的な免疫能の亢進による可能性が考えられた⁶⁾が、humoral factor を介する造血幹細胞の活性化¹³⁾や血小板に付着して表面荷電を変え、破壊を促進させ、feed back control によって thrombopoietin の産生が亢進するため¹⁴⁾といった知見があるが、いずれも造血細胞の場である網内系とのかかわりをさし示している。

4.4 ワクチン

腸チフス・パラチフスワクチンがマウスやイヌに有効であった¹⁵⁾。しかし、毒性のほうもかなりたく、イヌでは発熱、嘔吐を伴っている。致死量に近い量を

投与しないと著明な効果が得られない印象を受ける。

4.5 脂質

オリーブ油をマウスに 1 ml 腹腔内投与すると有効であるとの報告がある¹⁶⁾。顆粒球の回復が促進されているが、それが真の作用機作なのかという点で疑問がある。分散した油がガラス粉末などと同様のはたらきをした可能性がないとはいえない。ヒトに換算すると、投与量は 2 l にもなる。

4.6 核酸および関連物質

多くの研究報告が高分子 DNA の有効性を示している¹⁷⁾。照射によって DNA が損傷を受けやすい実験事実から、失われた情報を、投与した DNA が補うためなど推定されている。RNA についても、その有効性が報告されているが¹⁸⁾、標品中に含まれている lipopolysaccharide が効いているとの報告もある^{19), 20)}。また、RNA のアルカリ加水分解物やモノヌクレオチドの有効性については、さきにふれたように、菅原らの総合的研究がある。一般的にいって、核酸関連物質の作用機構はよくわかっていない。

4.7 生薬成分

ソビエトの研究者が、宇宙飛行を想定してとおもわれるが、植物抽出液を投与して X 線照射と加速度との関連でマウスの死亡率に対する効果をしらべているが²¹⁾、そのなかで *Eleutherococcus* (ウコギ科) の生理的食塩水抽出液が照射後投与で生残を高めている。同時に試みた薬用ニンジンの抽出液の効果には統計的な有意差がみられないが、ニンジンなどの生薬抽出物を用いた最初の試みとおもわれる。*Eleutherococcus* の有効成分については、さらに追究する価値があるとおもう。

薬用ニンジンについては、最近われわれが得た結果をのちにあらためて紹介する。

4.8 組織抽出物

放射線感受性の高い組織でのカルシウム濃度を高めると再生が促進されるだろうとの考えで、ウシ副甲状腺抽出物をラットに試みて生残率を高めている²²⁾が、マウスでは無効であった²³⁾。いっぽう牛乳や Na-caseinate を 1 匹あたり 70 mg 腹腔内注射すると無照射および照射マウスで骨髓細胞の分裂が促進され、30 日後生残率が高まった。Ca-caseinate が無効であったの

で、これらの投与によって生じる一過性の血中 Ca 量の減少が副甲状腺ホルモンの分泌を促進するためと考えられている²³⁾。

回復促進物質の投与によって、造血組織を活性化する humoral factor が増産されるのではなかろうかとの考えから、ワクチンや endotoxin を注射した無照射マウスの脾臓ホモジネートの抽出液をセファデックス G-200 でゲルろ過して得られた画分を照射マウスに注射すると、生残率が高まった²⁴⁾。humoral factor に関する知見が増せば、回復促進物質のスクリーニングにも利用できるのではなかろうか。

4.9 血小板輸血

骨髄死の主因が血小板減少症であることが、清浄マウスを使った中村らの実験によって明確にされた²⁵⁾。血小板に富んだ血しょうを輸血すると、放射線死が減少し、血小板を含まない他の血液成分ではその効果がない²⁶⁾。血小板輸血によって放射線死を防ぐためには、多量の新鮮な血液を必要とする(1回あたり、2匹分の全血から得た血小板を、数回にわたって投与)が、他の方法のように被曝のすぐあとでの投与が必須ではない点で、この方法はきわだっている。

4.10 骨髄移植

照射によって損傷を受けて減少してしまった造血幹細胞を外から移植によっておぎなう方法²⁷⁾は原理的にもっとも優れているであろう。多くの研究があるが、免疫学的“拒絶反応”のカベの克服が実用化への課題のようである¹⁴⁾。

4.11 抗血小板血清

照射前投与でマウスに用いられているようであるが、回復促進物質の作用機構を論ずるうえで欠かせないので特筆すべきものと考え。投与によって血小板と不可逆的に結合して血小板数を減少させると、血液中に血小板の造血を促進する因子が増加するが¹⁴⁾、抗血清を投与したマウスに照射すると生残率が高くなる¹⁴⁾。

5. 薬用ニンジン抽出物による放射線障害の回復

近年、和漢薬の1つである薬用ニンジン (root of *Panax ginseng*, C. A. Meyer, 俗称朝鮮人参) がラットやヒトの骨髄細胞の分裂や DNA, タンパク合成な

どを促進するという知見が得られた^{28), 29)}。そこで、われわれは、これをX線照射したマウスに用いて骨髄死を防ぐことができないかと考えて実験を始めたところ、著明な効果を認めたので、有効成分の精製と作用機構の解明をめざしているが、この項ではいままでに得られた知見についてその大略を紹介したい。

5.1 材料と方法

薬用ニンジン抽出物(以下、抽出物と略す)は富山医科薬科大学和漢薬研究所大浦研究室で開発された方法³⁰⁾にもとづき、Tris-HCl 緩衝液抽出、濃縮、0.7飽和硫酸沈殿、透析、凍結乾燥を行って得た。X線照射は深部治療用装置を用い、200kV, 20mA, 0.3 mm Cu + 0.5 mm Al フィルター、毎分50Rの条件で、720Rを全身照射した。照射直後に抽出物の生理的食塩水溶液(不溶成分は除いた)0.2mlを腹腔内注射によって投与した。また、生理的食塩水投与群を対照とした。効果の判定は、30日後生残率を χ^2 検定(Yatesの補正を含む)して有意差検定によって行った。

5.2 予備実験

まず、予備的段階では、自家繁殖させたNIH-Swiss系マウス(照射時8週令の雄)を用い、650~675R照射し、直後に抽出物1~4mgを投与したところ、表2に示すように30日後生残率が有意に増加した³¹⁾。このときマウスは10日目ごろから死に始め、20日目ごろまで死亡が続いた(図1)が、生残率の差はこの期間にみられたことから、抽出物が“骨髄死”を防いだことがわかる³²⁾。

表2 X線照射マウスの生残に対する薬用ニンジン抽出物の効果

実験番号	照射線量(R)	投与量(mg)	30日後生残率(%)		危険率
			対照群	投与群	
1	650	1.0	33(15)	78(15)	<0.01
2	675	4.0	27(30)	77(30)	<0.001
3	675	4.0	32(25)	84(25)	<0.001

カッコ内は用いた動物数をあらわす。

5.3 抽出物の効果

さて、統計的な取扱いのためには、今後の実験で多数のマウスを必要とすることが予想されるために、市販のマウスを用いることにした。JCL-ICR系マウスを4週令で購入し、1群40匹として、6週令で720R

図1 675R 照射マウスの生残。A, 生理食塩水投与；B, 抽出物 4 mg 投与。(表2の実験番号2と3のデータを集計して作成した)

を照射し、直後に抽出物を投与すると、1.8mg の投与で有意に ($p < 0.001$) 生残率が増加した。6.8mg の投与では対照の5%から82.5%にまで生残率が上昇した。

5.4 投与方法による効果のちがい

抽出物を腹腔内注射した場合と、静脈注射した場合で効果にちがいがあるかどうかをしらべた。抽出物 5.0mg を照射直後のマウスにこれら2種の方法で投与したところ、両者の30日後生残率には有意差がみられなかった。そこで、以後の実験では手間のかからない腹腔内注射を採用することにした。

5.5 血液像・臓器重量に対する抽出物の効果

抽出物の作用機構を知る手がかりとして、まず血液像と臓器(脾臓と胸腺)重量の変化をしらべた。照射線量が720Rではマウスが死亡して生き残り個体しかとれないので、線量を550Rに減らし、照射後抽出物 5.8mg を投与して、経時的に、照射前および照射後1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22, 30日にサンプリングした。1回220匹を用いた実験を2回行って集計した。まず、尾静脈から採血し、中村らの方法で血小板を視算、続いて眼瞼から採血して赤血球と白血球を自動計数した。なお、採血は午前10時から11時の間に行った。断頭放血後、脾臓と胸腺を摘出して重量を測定し、固定液中に保存して観察とDNA定量を行った。血液像に関しては、無照射の場合には抽出物投与に大きな変化をもたらさなかったが、照射した場合には回復が促進された。抽出物投与マウスの回復はいずれも10日目ごろからみられるが、生理的食塩水投与の対照にくらべて有意の差は血小板、赤血球につい

ては14, 18, 22日目に、白血球については10, 14日目にみとめられた。また、脾臓重量は無照射の場合には抽出物投与によって増大し、投与2日目には2倍に達し、以後漸減して14日目に対照の値に戻った。照射した場合には1~6日目には抽出物投与側の重量減少は少なく、以後の回復も促進され、対照でまだ回復のみられない10日目にはすでに照射前の値に回復した。臓器重量の回復にともなう、細胞分裂があるはずなので、脾臓あたりのDNA量をBurton法で測定したところ、対照群では照射後10日目以降にならなければ増加、回復しないのに対して、抽出物投与群では8日目にはほぼ、そして10日目には完全に照射前の値まで回復した。なお、胸腺重量に関しては抽出物の投与効果はほとんどみられなかった。これらの結果から、抽出物が放射線照射したマウスの造血臓器の障害を回復させ、血液像を復旧させることがわかった。550R照射での結果がただちに720R照射の場合での作用機構に結びつくとは断言できないが、推察の根拠にはなるものとする。

5.6 抽出物による脾臓重量の増大は必須か?

さて、無照射マウスで、抽出物投与によって脾臓重量が著しく増大することを述べたが、この現象が抽出物の放射線障害回復促進効果の発現に本質的に関連があるのか、ということが問題になる。この、脾臓の腫大現象は、墨粒子²⁹⁾や菌体内毒素²⁴⁾の投与でもみられ、ともにマウスでは放射線障害回復促進効果のあることが知られていて墨粒子の場合、脾臓の摘出によって、その効果が減少することが報告されている³⁰⁾。そこで、5週令で脾臓を摘出し、1週間後に770Rを照射したのち(線量を50R追加したのは、摘出によって放射線感受性が低下することが知られているからである)、抽出物 6.0mg を投与したところ、無処理マウスと同様に、対照の食塩水投与にくらべて30日後生残率は有意に ($p < 0.001$) 増加した。脾臓摘出マウスについて上と同様に、550R照射後の血液像の変化を観察すると、この場合には血小板数の回復が促進され、14, 18日目に対照の約2倍の値を示したが、赤血球数や白血球数の回復は促進されなかった。これらの結果は、放射線障害の回復には血小板数の回復が重要な意味をもっていることを示す。血小板の体内プールは非常に小さいから¹⁰⁾、これはまた、血小板の産生が重要であることを示す。また、回復期の脾臓では赤血球の産生が盛んであることをも示している。

5・7 副作用の除去

脾臓重量の増大が障害回復に必須でないとするれば、この“副作用”をとり除くことができないだろうか？これを試みるために、抽出物溶液を熱処理して、生じた沈殿（もとの約70%）を除去した上澄みを用いてみた。なお、このものが、回復促進効果を保持していることはあらかじめ確認した。その結果、もとの抽出物では投与後1～4日の間続いていた体重減少が熱処理でなくなり、脾臓の重量増加もほとんどみられなくなった。この結果はまた、さきの脾臓重量の増加が必須ではないという脾臓摘出のさいの結果とも一致する。

5・8 投与時期と効果

いままでの抽出物の投与はすべて照射直後（5分以内）の投与であったので、つぎに、投与時期を変えて、効果がどう変化するかをしらべた。まず、抽出物5.0mgを照射24時間前、2.5時間前、直後、2.5時間後、または24時間後に投与したところ、24時間前の30日後生存率がもっとも高く、2.5時間前がそれに続いた。直後と2.5時間後がほぼ同じで、24時間後の投与では効果は低下して対照との間に有意差がみとめられなくなった。つぎに、投与時期をもっとさかのぼって、照射の5、3、2、1日前または直後に投与したところ、5日または3日前投与では無効で、2日または1日前がもっとも有効であることがわかった。

5・9 有効成分の精製

それでは、ニンジン抽出物に含まれるなにが回復促進効果をもっているのだろうか。薬用ニンジンを選んだのは、骨髓細胞を活性化するという理由によるから、まず、その作用をもつといわれるニンジンサポニンに注目した。サポニンはメタノールに溶けるから、抽出物にメタノールを加えて、可溶性成分を得て、この5mgを照射後のマウスに投与して効果をみたところ、これは無効であった。また、もとの薬用ニンジン粉末を柴田法³⁴⁾にもとづき熱メタノールで抽出してエーテルで沈殿させて得た粗抽出物もまた、10mgまでの投与では無効であった。そこで、振り出しに戻って、抽出物の定性反応をみると、ビュレット反応が陽性で、タンパク質を含むことがわかった。もしも有効成分がタンパク質ならば、酸やアルカリで失活するだろうと考えて、0.12N HCl または NaOH の存在下で、60°、15分間加温すると、放射線死を防ぐ効果は非常に減少した。この結果からは、有効成分がタン

パク質だと断定することはできないが、一応、タンパク質をめやすくして精製を試みることにして、まず、CM-セルロース・カラムクロマトグラフィを行った。0.02M KH_2PO_4 で平衡化したカラムに抽出物溶液をとおすと、そのまま溶出する成分（非吸着成分）と、0.05M KH_2PO_4 -0.05M リン酸緩衝液（pH 7.4）の linear gradient elution で単一ピークを示す成分（吸着成分）の2つにわかれた。これらの成分を脱塩、凍結乾燥して得た標品をその重量収量比にあわせて、照射したマウスに投与したところ、両方とも有効であったが、その有意差は、非吸着成分よりも吸着成分のほうが大で、効果の主体は吸着成分にあることがわかった。この成分は Liebermann-Burchard 反応が陰性なのでサポニンを含まず、紫外吸収スペクトルから Warburg-Christian の方法で概算すると核酸をほとんど含まないことがわかった。この溶液を、pH 7で沸とう水浴中、加熱すると、沈殿（84%）を生ずるが、沈殿を除いた上澄みは有効であった。この上澄みをさらに Sephadex G-75 カラムを用いてゲルろ過を試みると、3つの成分にわかれた。これらの成分を、さきの CM-セルロース・カラムクロマトの場合と同様に処理して、その有効性をしらべたところ、そのうちの2つは（0.4～0.8mg の投与で）有効で、1つは無効であった。目下、この2つの成分について純度の検定をすすめている。これまでの精製のプロセスを表3に示す。

5・10 考察

これまでに得られたデータから、抽出物がX線照射したマウスの骨髓死を防ぐこと、そして血小板数の回復が重要であるらしいということが推察された。照射24時間後の投与では効果が非常に低下することから、抽出物が直接に造血細胞を賦活するというよりも、むしろ、何段階かを經由して間接的に作用していると考えたほうがよさそうである。また、血小板輸血が放射線死を防ぐことが知られているが、抽出物が血小板の代替品として作用したとは考え難い。回復促進物質としてあげられる代表的なものには墨粒子や endotoxin があるが、墨粒子は inert substance として網内系を閉そくするため有効であると考えられている点¹²⁾、われわれの抽出物とは異なっているようにおもえる。また、endotoxin や腸チフス・パラチフスワクチンなどは、脾臓を腫大させる作用があるが、われわれの抽出物そのものにも同じような作用はあるものの、これを

表3 精製のプロセス

熱処理したものは放射線障害回復促進効果を有しながら脾臓を腫大させる“副作用”がほぼ除かれた点で異なっている。しかし、基本的に異質なものかどうかを判定する材料は現在のところない。墨粒子や endotoxin などは網内系となんらかのかかわりをもって作用していると考えられていることから、われわれの抽出物も、この可能性を追求していくのが近道のようにおもわれる。

いっばう、有効成分を単離していない現時点では、これがタンパク質であるとの断定はできないが、もしタンパク質であるならば、連続して用いるさいには免疫上の問題が発生するかも知れない。その場合には、小分子の active subunit が得られるかといった点が課題になるであろう。

われわれは現在、科学技術庁の原子力平和利用研究委託費によって、マウス以外の動物、ラットとモルモットについて抽出物の有効性の検討を始めたばかりであり、ヒトへの応用の道はまだ遠い。

上にのべたわれわれの結果については詳細なレポートを現在準備中である。

有効成分の精製にあたり助言をいただいた大阪大学薬学部上原喜八郎教授と、血小板数の測定法と、作用

機作についての知見をご教授くださった愛知県がんセンター研究所中村弥部長に感謝いたします。

文 献

- 1) 江上信雄 (編): 放射線障害の回復, p.265, 朝倉書店 (1970)
- 2) M. M. Elkind and H. Sutton: *Nature*, **184**, 1293 (1959)
- 3) M. M. Elkind and H. Sutton: *Radiat. Res.*, **13**, 556 (1960)
- 4) シンポジウム「放射線障害の回復」報文集, 放射線医学総合研究所 NIRS-Re (1969)
- 5) 菅原 努: *Radioisotopes*, **22**, 95 (1973)
- 6) J. F. Thomson: *Radiation Protection in Mammals*, Reinhold Publishing Co., New York (1962)
- 7) A. Petkau, K. Kelly, W. S. Chelack, S. D. Pleskach, C. Barefoot, and B. E. Meeker: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **67**, 1167 (1975)
- 8) A. Petkau, W. S. Chelack and S. D. Pleskach: *Int. J. Radiat. Biol.*, **29**, 297 (1976)
- 9) S. Nakamura: *Radiat. Res.*, **52**, 130 (1972)
- 10) K. J. Mori: *ibid.*, **56**, 494 (1973)
- 11) F. Smith, W. W. Smith, H. L. Andrews and M. M. Grenan: *Am. J. Physiol.*, **182**, 396 (1955)
- 12) K. J. Mori and Y. Ito: *Radiat. Res.*, **69**, 134 (1977)
- 13) 森 和博: 代謝, **15**, 107 (1978)
- 14) 中村 弥: 放射線障害の回復(江上編), p.151, 朝倉書店 (1970)
- 15) E. J. Ainsworth and F. A. Mitchell: *Radiat. Res.*, **34**, 669 (1968)
- 16) M. Masgood and J. K. Ashikawa: *Int. J. Radiat. Biol.*, **4**, 521 (1961)
- 17) D. Petrovic: *Current Topics in Radiat. Res.*, Vol. 4, p. 253, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1968)
- 18) J. Maisin, P. Dumont and A. Dunjic: *Nature*, **186**, 487 (1960)
- 19) E. Gabler und W. Stökl: *Strahlentherapie*, **127**, 287 (1965)
- 20) J. P. Ebel, G. Beck, G. Keith, H. Langendorff

- and M. Langendorff: *Int. J. Radiat. Biol.*, **16**, 201 (1969)
- 21) I.I. Brekman, L.I. Oskotsky and A.I. Khakham: *Med. Radiol.*, **5**, 33 (1960)
- 22) R.H. Rixon, J.F. Whitfield and T. Youdale: *Nature*, **182**, 1374 (1958)
- 23) R.H. Rixon and J.F. Whitfield: *Radiat. Res.*, **40**, 601 (1969)
- 24) K. Tsuneoka, Y. Takagi and M. Shikita: *J. Radiat. Res.*, **18**, 102 (1977)
- 25) 中村 弥, 古瀬 健, 春日 孟: 日本放射線影響学会第19回大会講演要旨集, p.50 (1976)
- 26) W. Nakamura: *Radiat. Res.*, **55**, 118(1973)
- 27) E. Lorenz: *J. Natl. Cancer Inst.*, **12**, 197 (1951)
- 28) 山本昌弘, 林 良明, 大島仁土, 牧野英一, 板谷喬起, 鈴木 豊, 熊谷 朗: 第6回和漢薬シンポジウム, p.49 (1972)
- 29) H. Oura, S. Nakashima, K. Tsukuda and Y. Ohta: *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 980 (1972)
- 30) H. Oura, S. Hiai, Y. Odaka and T. Yokozawa: *J. Biochem.*, **77**, 1057 (1975)
- 31) M. Yonezawa: *J. Radiat. Res.*, **17**, 111 (1976)
- 32) L.G. Lajtha: *Curr. Topics in Radiat. Res.*, Vol. 1. p. 141, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1965)
- 33) K.J. Mori and Y. Kitamura: *Int. J. Radiat. Biol.*, **30**, 487 (1976)
- 34) S. Shibata, O. Tanaka, T. Ando, M. Sado, S. Tsushima and T. Ohsawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 595 (1966)
-