

X線照射時に発生せる細胞毒の研究について

第一編

X線照射家兎より抽出した不飽和脂肪酸分画の Ehrlich 腹水癌、
正常肝のコハク酸脱水素系に及ぼす影響について

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：武田俊光教授）

副 手 塩 飽 緑

〔昭和35年4月23日受稿〕

緒 言

X線が与える生体への影響の中で現在最も大きい生化学的細胞化学的課題は細胞障害がミトコンドリアと核の何れに於て始まるかと云う事である。一部の人はミトコンドリアが初めに障害されるとし、他は核であると、現在なほその何れであるかと断定する程の明確な実験データはない様である。勿論核並にミトコンドリアと云う Organella は形態的に示される部分であり、それらは云う迄もなく同時に細胞の核酸代謝及び呼吸と云う生化学的代謝過程に結びつけられて考えられる。

先に山本¹⁾等はX線照射による家兎肝より抽出された不飽和脂肪酸分画がX線照射による細胞の変化と類似の生物作用を示す事を観察し、その飽和度、或は二重結合の数よりその分画をさらに4つの分画に分離し、それ等が示す核酸代謝、或いは呼吸に及ぼす影響について一部の研究を発表し、その何れにも影響を与えるが、特に核酸代謝への影響は大きく D. N. A.、R. N. A 合成の障害が起る事を見出している。

著者は、これとあいまつてX線障害としてしばしば問題にされるミトコンドリアに局在する呼吸酵素系の本物質の影響について研究し、此処では終末電子伝達系として一般に云われているコハク酸脱水素酵素系、Cytochrom-c. Cytochrom Oxidase 系 DPNH Dehydrogenase 系中コハク酸脱水素酵素系について得られた結果を報告する。

材料及び方法

材料は Ehrlich ascites Tumor の cell suspension 及び maus-liver の Homogenate を使用した。

Ehrlich ascites tumor cell は純系 maus に 0.2 cc づつ Ehrlich 腹水癌を移植し5日目の腹水を注射器にて取り出し、生理的食塩水で1~5回洗滌した物を用いた。又 liv-r-Homogenate は純系 maus の肝 0.5 mg/10cc の pH 7.6 の 0.1 M phosphate buffer Homogenate を使用した。

不飽和脂肪酸分画はその分画により一応 mix-OX, OX₀, OX₁, OX₂, OX₃, 分画として示し、これ等を200~500万/ccの細胞を含む Ehrlich 腹水癌の生理的食塩水浮遊細胞についてそれぞれ 0.0025%, 0.005%, 0.01%, 0.025%, になる様に加え、37°Cの恒温槽中に incubate し、0.1, 3, 6, の各時間に取り出してコハク酸脱水素酵素活性の変動を測定した。又肝 Homogenate については小田²⁾により示された原法をその儘使用した。即ち、コハク酸脱水素酵素活性の測定は次の方法である。

反応液は：基質…Sodium Succinate 0.2 M 0.2 cc
水素系溶体…Neotetrazolium chloride 2% 0.2 cc

酵素液…肝 10 mg/0.2 cc の 磷酸 buffer による。

Homogenate、或いは200~500万/ccの Ehrlich ascites tumor cell…0.2 cc

Ehrlichの場合、Phosphat buffer 0.2 cc を加える。

の混合液で反応は 37°C 1hr incubation により行つた。なほ Ehrlich ascites tumor cell については同一系列については細胞数でコハク酸脱水素酵素活性を示す目的で細胞数の測定を血球計算盤にて測定した。

この様にして反応した液は直射光線をさけ10%ホルマリン 0.4 cc を加えて反応を停止せしめ、アセ

トン、エーテル (1:1) の混合液にて抽出 (抽出は毎分約100回の Shaker にて振盪した) し、抽出液量 (V) にその液の 530 m μ に於ける吸光度 (E) を乗じた EV の値をコハク酸脱水素酵素活性度とした。なほ吸光度の測定には島津ベックマン分光光度計及び日立光電光度計により測定した。

実験結果

先づ Ehrlich ascites tumor cell に対する OX₁ 物質の影響について述べる。

今、生理的食塩水にて1回洗滌した Ehrlich 腹水癌に対する OX₁ の各種濃度 (0.0025%, 0.005%, 0.010%, 0.025%) の影響を見るに、図1の如く、上記のすべての濃度の OX₁ により OX₁ を入れた直後は対照に比して著しい酵素活性の増大があり1時間後では高濃度の物は対照より低下し、低濃度のものは高い値を示しているが3時間、6時間となるに従つて OX₁ を入れた実験群の方が対照より低い値を示す様になる。これに対して5回洗滌した Ehrlich 腹水癌細胞ではすでに1時間値でほとんどすべての実験群の方が対照より低値を示している。(図2) 亦3回洗滌のものではその中間値を示している。(図6) 亦注意すべきは個在基質反応が Ehrlich 腹水癌では高く、その値は細胞の洗滌回数の増加に従つて低下している。

次に正常マウス肝の Homogenate のコハク酸脱水素酵素活性に対する mix-OX の影響について述べ

Fig. 2 Effect of OX₁ substance on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich tumor cells. (Cell number 229 \times 10⁴)

Cells are washed 5 times with physiological saline solution

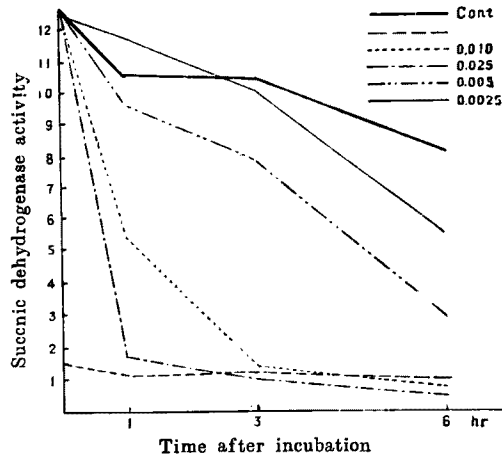
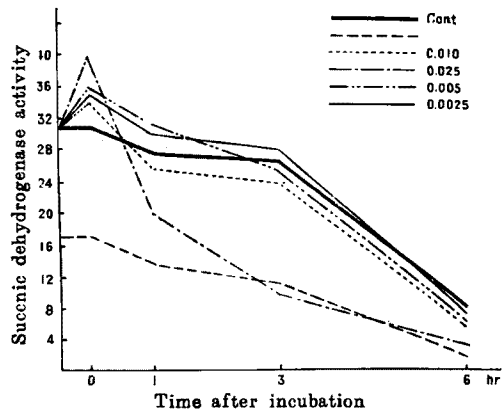


Fig. 1 Effect of OX₁ substance on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich ascites tumor cells. (Cell number 490 \times 10⁴)

Cells are washed 1 time with physiological saline solution



ると 0.0025% mix-OX から 0.025% の濃い濃度にいたる迄すべて1時間後に於てすべてに対照より低い値を示し、その低下の度合は濃度と平行している。(図3)

次に mix-OX の Ehrlich 腹水癌細胞のコハク酸脱水素酵素に与える影響は図4に示す如く0.0025% 及び 0.005% の液に於て1時間作用後に control より活性の増大が示され0.01% 及び 0.025% では著しい活性の低下を示している。

OX₀ 分画の本酵素に対する影響は図5に示す如く0.0025%, 0.005%, 0.01% の濃度に於て1時間作用後も control より高い値を示し、その中でも

Fig. 3 Effect of mix-OX on the succinic dehydrogenase activity of maus liver homogenate (10 mg c. c)

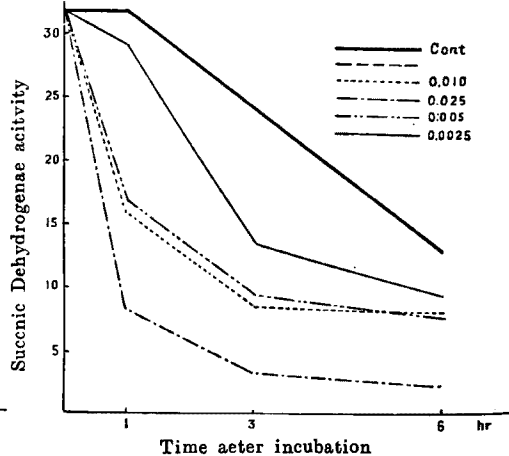


Fig. 4 Effect of mix-OX on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich ascites tumor cells (Cell number 340×10^4)

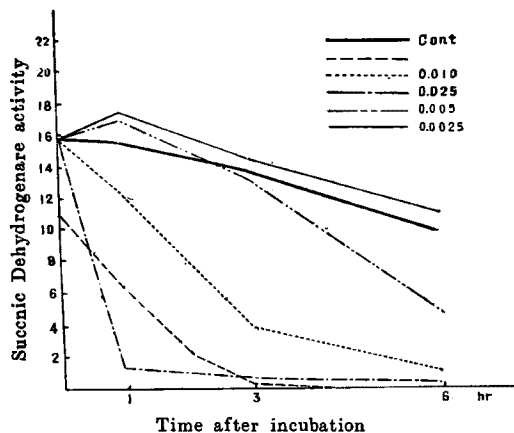
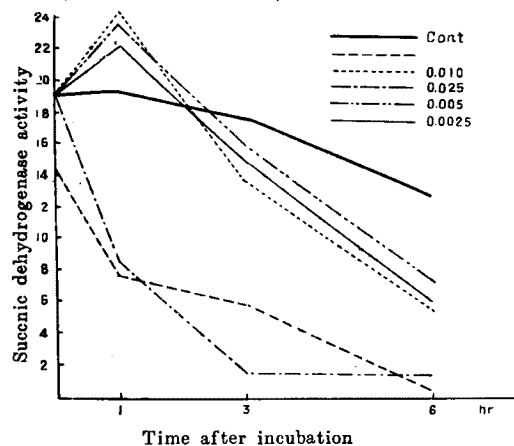


Fig. 5 Effect of OX_0 substance on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich ascites tumor cells (Cell number 337×10^4)



0.0025%よりも0.005%, 0.01%の方が高い値を示す。これに対して0.025%では1時間作用後でcontrolより極めて低い値を示している。さらに3時間後ではすべてcontrolより低い値を示す様になるが中でも0.025%のそれは著しい。

次に OX_1 分画についてのべると OX_0 とほぼ同様の傾向が示されるが、 OX_0 に比して0.01%の低濃度に於ても1時間作用ですでにcontrolよりも低い値を示している。(図6)

OX_2 分画では3回の細胞洗滌ですべての濃度に於て1時間作用後controlよりも低い値を示している。又その低下の度合は3.6時間に於ても同様である。(図7)

OX_3 分画に於ては再び OX_1 分画と同様0.0025%

Fig. 6 Effect of OX_1 substance on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich ascites tumor cells (Cell number 354×10^4)

Cells are washed 3 times with physiological saline solution

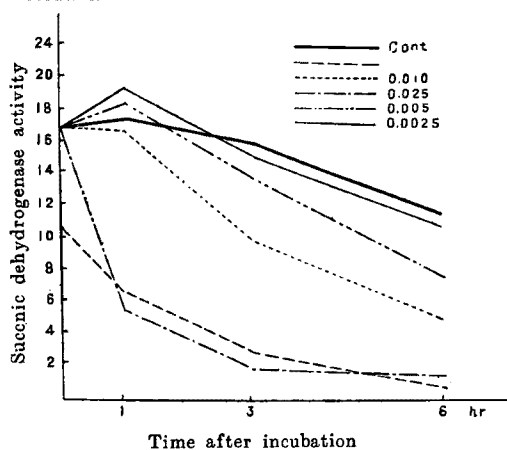
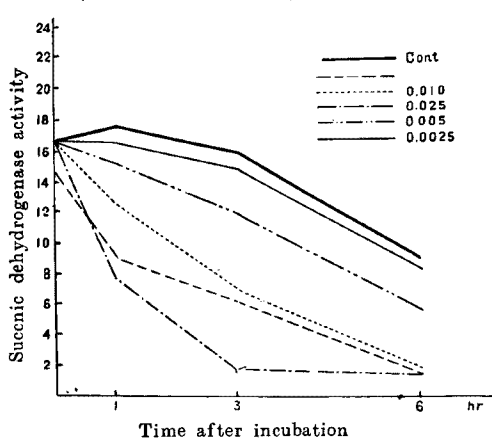


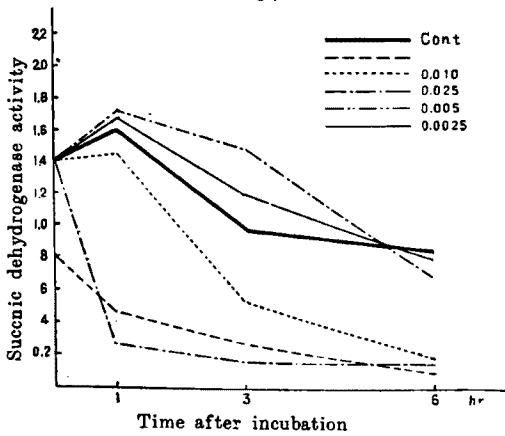
Fig. 7 Effect of OX_2 substance on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich ascites tumor cells (Cell number 377×10^4)



0.005%に於て1時間値がcontrolより高い値を示し、それより高濃度に於ては何れもcontrolよりその活性は低下し、作用時間の延長に於てもその傾向は保たれている。(図8)

又一般的に見て、肝 Homogenat の個在基質反応はほとんどないに近いものが Ehrlich 腹水癌細胞では非常に高く高い場合には(2回洗滌した細胞)80%近い値を示すものさへあるが 37°C incubation により速かに不活性化され6時間後にはほとんど活性は0に近くなる。

Fig. 8 Effect of OX₃ substance on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich ascites tumor cells (Cell number 344×10⁴)



考 察

先に述べた如く Succino Oxidase 系は Singer³⁾⁴⁾, Schneider⁵⁾⁶⁾, Peason⁷⁾, Green⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾, 市川¹¹⁾, 小田²⁾¹²⁾¹³⁾ 等によりそれがミトコンドリアの表面及びクリスタに一致して存在し特にクリスタの二重膜構造に一致する事が電子顕微鏡組織化学的により明らかにされた。又 Green¹⁰⁾ の示した P. E. T. P. Particul, ETP Particul 分離の成功によりその電子伝達が一定の形態構造と密接な関係にあり構造の破壊により電子伝達がスムーズに行なわれなくなる事が明らかにされた。従つて彼等の見解からすれば少なくとも一定の二重膜構造の保たれている状態では呼吸酵素活性は失なわれずその活性値の増大はしばしば四塩化炭素中毒その他の病変に於ても見られる所であり¹⁴⁾、一次的な呼吸の増大はその電子顕微鏡像から核膜近くの electron density の増加や Endoplasmic reticulum のミトコンドリアに近い部分での分布の増大等から何かそれ等相互間に酵素活性の増大を来す如き mechanism が招来されたとも考えられている¹⁵⁾。又一方、天野等¹⁶⁾ の云う一過性の呼吸酵素活性の増大がミトコンドリアに局在する酵素活性を抑制して居る物質が取除かれる事に由来するものであると云う解釈も出来る。然しこの事は又同一の OX 物質で単に Ehrlich 腹水癌細胞を生理的食塩水で 5 回洗滌した場合と 1 回洗滌した場合の比較に於て見られた如く後者では明らかに固在基質反応が強く亦一時的呼吸酵素活性の増大が比較的高濃度に於ても見られるに反し前者に於ては個在基質反応の活性も弱まり亦低濃度に於ても一時的な呼吸の増大が

小さくなる事等から非常に細胞の変性を起し易い状態では OX 物質が作用し易く（呼吸に対する作用が表われ易く）なる事は明らかである。従つて本実験で示された各種の OX 物質の作用が比較的作用時間の短い期間ではむしろ呼吸酵素活性を増大し長時間の作用によつては細胞そのものが生理的好条件下にないために変性し易い状態におかれた事になり酵素そのものへの影響としてより細胞が変性し易いためと解釈される。その事は同じ OX. Mix の正常肝 Homogenate 及び Ehrlich ascites tumor に対する作用を 1 時間値で比較して見ても Homogenate の方が非常に速に酵素活性の低下を示す事からもうなづける。従つて高濃度の OX 物質を作用せしめた時にも一過性に非常に短時間で一時酵素活性が高められる事も想像される。亦 OX 物質を作用せしめて呼吸の測定を行つた金政¹⁷⁾ 等の実験結果では OX₀, OX₁ ではほとんど呼吸障害はないと云はれ生理的条件下ではむしろほとんど呼吸酵素に対する作用はないのかも知れない。然し何れにしても OX 物質により一時的に呼吸酵素が増加しその後対照より活性度の低下する事は少なくとも Homogenate 或いは生理的食塩水で洗滌された Ehrlich 腹水癌細胞に於ては明らかな事実であろう。然し細胞変性に基く呼吸酵素の低下が酵素活性の変動が酵素そのものの阻害作用で低下するのは明らかでない。更に又癌細胞に於て殊に個在基質反応が強く見られ又 OX 物質が増殖性癌細胞に特によく作用する事から考えて個在基質反応に対する影響についても実験が必要であり又最も生理的条件に近い *in vivo* に於ける同物質の酵素活性に与える影響についても実験する必要がある。又本実験では単にコハク酸脱水素酵素系についてのみの実験結果であり今後 Cytochrom-C, Cytochrome Oxidase System, DPNH dehydrogenase activity に対する作用についても追求したいと考える。

結 論

X 線照射動物（家兎）より分離された不飽和脂肪酸の正常 Maus 肝, Ehrlich ascites tumor Cell の Succinic dehydrogenase activity に与える影響を生化学的に neotetrazolium の還元量により定量した結果を得た。

1) 正常肝磷酸 Buffer Homogenate に対し此の不飽和脂肪酸は明らかにコハク酸脱水素酵素活性を低下せしめその度合はほぼ濃度に比例した。

2) Ehrlich ascites tumor cell に対しては比

較的正常（洗滌により細胞を弱らしめない）の物では一時的にむしろ酵素活性を高め作用時間の延長により対照よりは低下せしめ生理的食塩水にて洗滌する回数を増加する事により一時的酵素活性増大の時期が非常に早められた、なほ阻害の度合は OX_2 , OX_3 , OX_1 , OX_0 , の順であつた。

以上の結果から本物質は正常細胞（変性をうけていない）に対しては大して影響を与えず亦高濃度に

於てはむしろ細胞変性を来す結果として呼吸酵素活性を低下せしめるものであると考えた。

稿を終るに臨み終始御指導御援助を賜つた恩師武田俊光教授、山本助教授に深甚の謝意を表わすと共に妹尾病理学教室の内海助手に併せて感謝の意を表し深謝致します。

参 考 文 献

- 1) 山本道夫：細胞化学シンポジウム，9；141，1959.
- 2) 小田琢三他：岡山医学雑誌，70；123，1958.
- 3) Singer, T. P., Kearney, E. B. and Massey, V.: Henry Ford Hospital International Symposium. New York Academic Press. Inc 1956. 417.
- 4) Singer, T. P., Kearney, E. B. and Massey, V.: Adv. in Enzymal 18；65，1957.
- 5) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem. 165；338，1955.
- 6) Schneider, W. C. and Potter, V. R.: J. Biol. Chem. 177；893，1949.
- 7) Peason, B. and Defedni, V.: J. Histochem. Cytochem. 2；312，1954.
- 8) Green, D. E.: 生化学，29；65，1957.
- 9) Green, D. E.: J. Biol. Chem. 217；551，1955.
- 10) Green, D. E.: 細胞化学シンポジウム，8；153，1958.
- 11) 市川収：細胞化学シンポジウム，4；11，1956.
- 12) 小田琢三：細胞化学シンポジウム，8；159，1958.
- 13) 小田琢三：細胞化学シンポジウム，8；173，1958.
- 14) 羽場喬一：未発表
- 15) Mölbert, E: Beitr. Pathol. Anat. 118；203，1957.
- 16) 天野重安：細胞化学シンポジウム，118；145，1958.
- 17) 金政泰弘：未発表

Experimental Studies on the Nature of X-Ray Disturbance

Part I. Effect of Unsaturated Fatty-Acid Fraction Extracted from X-Ray Irradiated Rabbit-Liver on Succinic Dehydrogenase System of Ehrlich-Ascites-Tumor Cells

By

Midori Shiaku

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Toshimitsu Takeda)

There are many investigations on the disturbances caused by x-rays but these works are consisted mainly of histo-morphological researches and rerely from the viewpoint of the acting mechanism of cells. More recently Lea, Barron et al, however, have studied the histochemical changes in the animals irradiated with x-rays and they have clarified the direct action

of x-ray irradiation to a certain extent.

In our laboratory Dr. Yamamoto has succeeded in isolating a certain cytotoxin from unsaturated fatty acid fraction, an extract of the liver of the rabbits exposed to x-rays. In the subsequent studies with this cytotoxin it has been found that this substance has an inhibitory action on the mitosis of tumor cells. Therefore, we have carried out a series of experiments to see the effect of this substance, in the presence of succinic dehydrogenase, on the respiration of Ehrlich-ascites-tumor cells. As the result it has been confirmed that this cytotoxin possesses an action as to depress both the respiration of the cancer cell and that of normal liver cells.
