

X線照射時に発生せる細胞毒の研究について

第二編

X線照射家兎より抽出した不飽和脂肪酸分画の Ehrlich
腹水癌のコハク酸脱水素系に於ける形態学的変化
並びに生体内反応について

岡山大学医学部放射線科医学教室（主任：武田俊光教授）

副 手 塩 飽 緑

〔昭和35年6月29日受稿〕

緒 言

X線の生物作用一連の研究として著者は先に¹⁾X線照射家兎肝より抽出した不飽和脂肪酸分画(OXと仮称)の maus 正常肝組織並びに Ehrlich ascites tumor cell に対し何れも呼吸酵素活性の阻害を示す事を報告し、特にその場合不飽和脂肪酸の高級なものほどその阻害の傾向の著しい事を見た。然しOXそのものが直接酵素活性を阻害するのか、或は mitochondria の構造破壊により二次的に阻害効果として現われるのか充分明らかでなく、先編の実験結果中 homogenate された組織或いは細胞の洗滌、長時間の incubation 等、細胞が degeneration され易い状態に置かれた場合の方が阻害され易い事から一応この阻害作用は mitochondria の変性に基くものではなからうかと考えた。

本編ではこれを形態学的に観察してそれ等の疑問を解く事を意図し、更に in vivo に於いてOXの Ehrlich ascites tumor cell の呼吸酵素等に与える影響について検索し、in vitro の実験結果に対比する事を試み、得られた結果について報告する。

材料及び方法

1) 形態学的変化観察の材料としては前回同様 Ehrlich ascites tumor cell suspension を使用した。

Ehrlich ascites tumor cell は純系 maus (c. b 系) に 0.2 cc づつ 10~15 万/mm³ 個 cell の Ehrlich ascites tumor cell 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 2 回洗滌（前回の実験結果洗滌回数を増すと固在基質反応が低下した事より今回は一応夾雑物が除ける程度に洗滌の回数を

減じた)したものを用いた。これを約 500 万/cc になるように生理的食塩水を媒体としてうすめ細胞浮游液を作りこれを 1 cc 採って中硬質試験管に入れ、不飽和脂肪酸分画は山本²⁾がX線照射家兎肝より妹尾³⁾の方法で抽出、更に分析したものより OX₀, OX₁, OX₂, OX₃ の分画を、OX mix は当教室に於て抽出したものを pH 7.4~7.6 の間で NaOH と HCl で修正し、これを生理的食塩水に 0.02% の濃度に溶かしたもの 1 cc づつ細胞浮游液を入れた試験管に加え（試験管内濃度は 0.01% になる）又対照には 1 cc の生理的食塩水を本物質の代りに入れた。

これ等の試験管を 37°C の恒温槽中にて incubate し 0 時間と 3 時間の各時間に取り出し反応液を加え 30 分 37°C の回転孵卵器の中で作用させ 10% ホルマリン溶液 4 cc で反応を停止せしめて取り出しストロヒを作つて検鏡した。

反応液：基 質…Sodium Succinate (0.2M)
1 cc

水素系溶体…Neotetrazolium chloride
(0.2%) 1 cc

酵 素 液…Phosphat buffer (pH7.6) 1 cc

の混合液である。

なお Ehrlich ascites tumor cell の細胞数測定には Bürker-Türk 血球計算盤で測定した。

2) 生体内反応観察の材料として純系 maus (c. b 系) の同腹の生後約 2 ヶ月のはほぼ同体重のものを選び出しこれに前述同様の Ehrlich ascites tumor cell を移植し、5 日目のものを使用した。

不飽和脂肪酸分画は実験動物の關係で OX₁ のみを使用した。

OX₁ を NaOH と HCl とで pH 7.4 に修正し、

生理的食塩水に2.0%の濃度に溶かしこれを0.2cc注射器にとり腹腔内に注入した。なお0時間測定のみには生理的食塩水を0.2cc注入した。

腹水を滅菌注射器にて1, 3, 6の各時間に各々1匹のmausより取り出し、2回生理的食塩水で遠沈洗滌し、これを500万/ccになるように生理的食塩水にてうすめこの1ccを前記同様の反応液と共に試験管に入れて37°C30分回転孵卵器の中で反応させ10%のホルマリン溶液4.0ccで反応を停止させてアセトン・エーテル等量液にて振盪抽出(抽出は毎分約100回のshackerにて振盪した)し抽出液量(V)にその液の530m 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。なお吸光度の測定には島津ベックマン分光光度計により測定した。

実験結果

1) OX物質のEhrlich ascites tumor cellのSuccinic dehydrogenase activityに対する影響を細胞化学的に観察すると無処理群は0時間では各腫瘍細胞は一樣にmitochondriaと一致してホルマザンの沈着が観察される(写真1. a)。3時間に於ても各腫瘍細胞は前記同様の変化を認め、時間的因子による活性度変化は差がない。勿論個々の細胞間に於ける酵素活性度の差は多少認められるが時間に関係なく、存在する総べての細胞に一樣に酵素活性を認める。

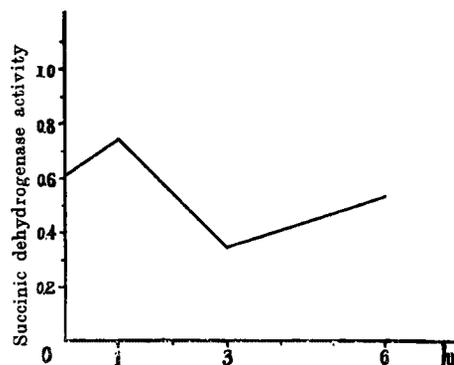
次に本物質処理群では0時間に於てOX₀よりOX₃までは無処理群に比べ明らかに個々の細胞は酵素活性が高まりmitochondriaと一致するホルマザンの沈着が観察される(写真2. a, 3. a, 4. a, 5. a)。各分画による酵素活性度の差はあまり変化が観察されないがOX mix(写真6. a)の酵素活性が一番低く対照と少しの差しか観察されない。しかしどの分画に於ても対照群よりホルマザンの沈着は量的に多く著明な酵素活性上昇を認めた。

3時間にては本物質処理群は各腫瘍細胞のSuccinic dehydrogenase activityはほとんどその活性を消失しホルマザンの沈着を認めず極く少数の腫瘍細胞にわずかにそれが認められる。分画による酵素活性度の差はOX₀(写真2. b)、OX₁(写真3. b)、OX₂(写真4. b)でOX₃(写真5. b)、OX mix(写真6. b)はあまり対照(写真1. b)と差が認められない。

即ち0時間に於て呼吸酵素活性が強く高くなつて

いる分画は長時間に於て呼吸酵素活性が低下している。

2) 次に生体内反応に於てEhrlich ascites tumor cellの呼吸酵素活性は図に示す如く1時間値に於て少し上昇を示し3時間値に於て著明な酵素活性減少を認めるが6時間値はほぼ正常に恢復した。



Effect of OX₁ substance on the succinic dehydrogenase activity of Ehrlich ascites tumor cells. (in vivo)

考 案

以上の実験結果について考察してみると、先づコハク酸脱水素酵素活性に対する本物質の影響を細胞化学的に観察した結果では明らかに高級不飽和脂肪酸(OX₀-OX₁)は一時的に呼吸酵素活性の増加を起さしめ、作用時間の延長に従つて高級不飽和脂肪酸ほど強く呼吸酵素活性を低下し、これ等の反応はすべて細胞内で示されている。即ち一応細胞内に於てその活性を低下し然も比較的細胞の形態は正常に近い。これに関しては小田、内海⁴⁾等がX線照射mausの骨髓細胞で観察した酵素活性に関する結果と一致し、従つて一部のmitochondriaはその形態が変化しているのが予想される。然しmitochondriaの構造が破壊されたために酵素活性を失つたのか、酵素活性そのものを阻害したのか明らかでなく、Green⁵⁾等の説に従えば呼吸酵素活性はmitochondriaの二重膜構造の存在が必要であるといわれ現在の段階ではこれを決定することは困難である。然しBarron⁶⁾⁷⁾⁸⁾等は試験管内実験から放射線障害作用はSH基の酸化に基くものとし、OX物質も山本、内海⁹⁾等の実験ではLipid peroxideを多量に含む事が知られ、それ等によりSH酵素である呼吸酵素が酸化されるとも考えられる¹⁰⁾。また同時にOXがmitochondriaの構成要素である磷脂質に対して親和性を有すると

も考えられ、その結果 mitochondria の電子伝達阻害を行うとも考えられる。このように考えれば著者の初期の目的、即ち mitochondria の破壊による酵素活性の低下か、酵素それ自体の阻害によるものかということに関してはその何れにも作用を及ぼしていると考えられる結果となる。残された方法としては電子顕微鏡細胞化学的¹¹⁾¹²⁾による酵素活性の観察、純粋呼吸酵素の抽出物に対する作用を追求する外はなく、今後この方面に対しても研究を進めたい。又写真にも示された如く一部の細胞では完全にその活性を消失し一部の細胞はむしろ活性の増加を示しているのが観察されるがこれ等と細胞の mitotic phase の関係について観察の努力を行つたが、細胞化学的反応中でしばしば細胞構造の変化が示され、位相差顕微鏡的に充分その像を掴みえられず、また重染色によつては反応色素の消失があり、成果を得る事が出来なかつたが、この関係も観察に成功すれば興味ある結果が予想される。何れにしてもこれ等細胞化学的反応が先の第一編¹⁾で述べた実験結果と全く一致するものであり、高級不飽和脂肪酸の誘導体ほど酵素活性に与える影響は大である。

次に in vivo の実験結果について考察すれば明らかに in vitro の実験に於けるより高濃度（腹水の平均量約 5 cc とすれば約 8 倍）にもかかわらずその変動は in vitro のそれと比較し非常に僅かである。然もその変動の傾向は同一濃度の in vitro の実験と比較すればゆるやかであり、然も 6 時間値で再び恢復の傾向を示す。これは、生体内に於ては種々の SH 保護物質⁶⁾⁷⁾⁸⁾¹³⁾¹⁴⁾により酵素の SH-group が保護

されることと、腹水中で一応生理的に理想的環境に作られているため細胞、mitochondria の変性も少い事の二つの要因によるものであらうと考えられる。

然も時間の経過と共に OX の濃度は次第に稀釈され、完全に障害されなかつた酵素活性の恢復が生じた事が考えられる。この事は制癌の効果と考えれば 6 時間値で示された酵素活性恢復期に第 2 回、更にそれに続く OX 物質の持続作用によりこの恢復を阻止する事が可能ではなからうかと考えられる。

結 論

X線照射家兎肝より抽出した不飽和脂肪酸分画の Ehrlich ascites tumor cell の Succinic dehydrogenase activity に及ぼす影響の形態学的変化並びに生体内反応について次の結果を得た。

1) 形態学的変化に於ては短時間に於て本物質は呼吸酵素活性を一次的に上昇せしめ長時間にては低下さす。これは第一編の結果とほぼ一致する。

2) 生体内反応という細胞の生理的好条件下に於ても本物質は腫瘍細胞の呼吸酵素活性を低下さす。

以上の結果より本物質は一次的には腫瘍細胞の呼吸酵素活性を高めるが一部は酵素そのものに作用し呼吸阻害に導くのではなからうかと考えた。

稿を終るに臨み終始御指導並びに御援助を賜つた恩師武田俊光教授及び癌研山本教授、内海助教に感謝の意を表し深謝致します。

参 考 文 献

- 1) 塩飽 緑：岡山医学会雑誌，72，4，1960.
- 2) 山本道夫：細胞化学シンポジウム，9，141，1959.
- 3) 妹尾左知丸：細胞化学シンポジウム，1953.
- 4) 小田，内海他：細胞化学シンポジウム，1953.
- 5) Green, D. E.：細胞化学シンポジウム，8，153，1958.
- 6) Barron, E. S. G.：Advance in Enzymology II，255，1951.
- 7) Barron, Dickman, S., Muntz, J. A. and Singer, T. P.：J. Gen. Physiol. 32，537，1949.
- 8) Barron, E. S. G.：Radiation biology. Vol. I. P. P. 283, Ed. by Hollander, M. C. Gaw-Hill, 1954.
- 9) 山本，内海他：未発表.
- 10) Ohlenghi, A., Bernheim, F. and Wilber, K. M.：Arch. Biochem 56，157，1955.
- 11) Person, B. and Defendi, V.：J. Histochem. Cytochem. 2，312，1954.
- 12) 小田琢三：細胞化学シンポジウム，8，173，1958.
- 13) Plaine, H. L.：Cancer Res. 15，151，1955.
- 14) Cater, D. B., Philips, A. F. and Silver, L. A.：Proc. Roy. Soc. B. 146/924，382，1957.

Studies on the Cell Toxin Produced by X-Ray Irradiation

Part 2. The Morphological Changes and in Vivo Reactions of the Succinic Dehydrogenase System in Ehrlich Ascites Tumor Cells Induced by the Unsaturated Fatty Acid Fraction Extracted from the Rabbit Liver after X-ray Irradiation

By

Midori Shiaku

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

In Part 1. the author investigated the effects of the unsaturated fatty acid fraction extracted from the rabbit liver after x-ray irradiation on the succinic dehydrogenase system in Ehrlich ascites tumor cells and in the normal rabbit liver, and it was concluded that although this fraction does not greatly affect the normal liver cells, at a higher concentration it seems to induce cell degeneration which in turn results in a decrease in the respiratory enzyme activity.

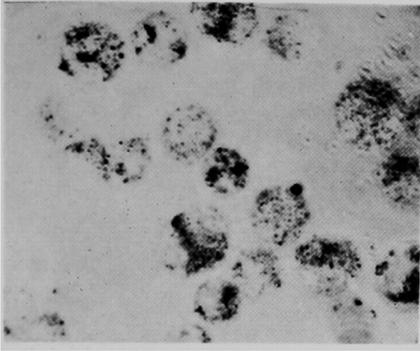
In the present experiment the author studied the morphological changes brought about by this substance in Ehrlich ascites tumor cell and the in vivo changes induced by it in the succinic dehydrogenase system. In conducting this experiment the results obtained by Yamamoto et al. of our department were referred to.

With respect to the morphological changes in the tumor cells, it was observed that this substance acting for a short period of time will accelerate the respiratory enzyme activity transiently while when acting for a longer period, it decreases the activity. These findings agree more or less well with the results in Part 1. Even in the in vivo reactions the respiratory enzyme activity in the tumor cells is elevated temporarily and when acting for a longer period of time this substance decreases the activity.

From these findings it is concluded that this substance does elevate the respiratory enzyme activity transiently but when it acts for a longer period of time, it seems to bring about a fall in the activity and further acting directly on the respiratory enzymes it induces the disorder in respiration.

塩飽論文附図

写真 1. a 対照 0 時間



1. b 対照 3 時間

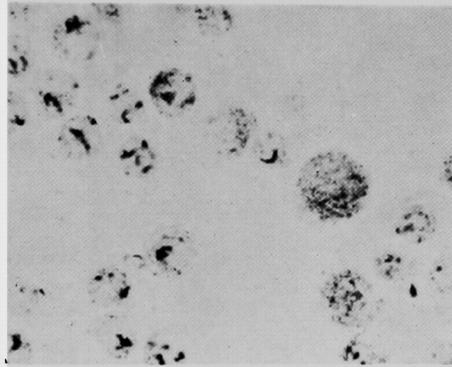
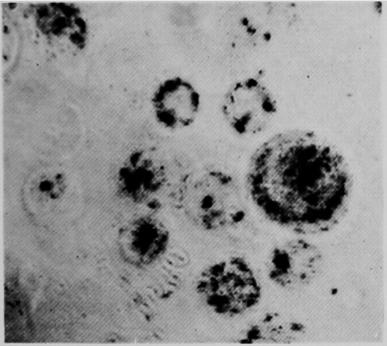


写真 2. a OX₀ 0 時間



2. b OX₀ 3 時間

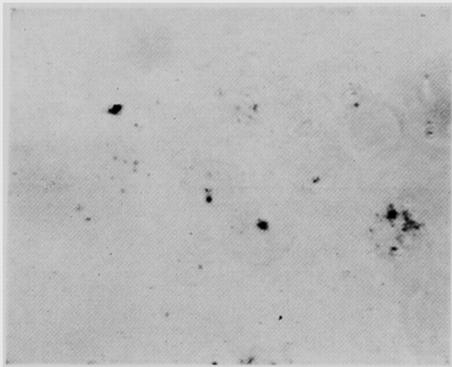
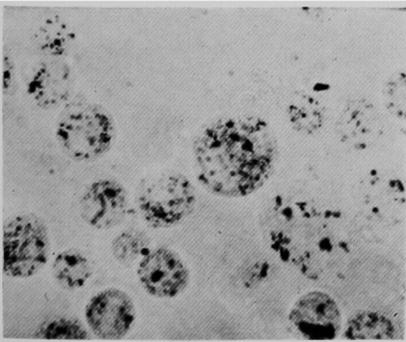
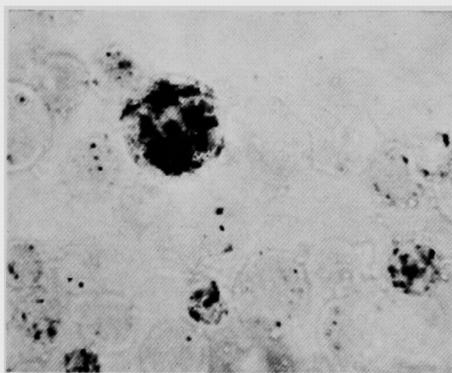


写真 3. a OX₁ 0 時間



3. b OX₁ 3 時間



塩 飽 論 文 附 図

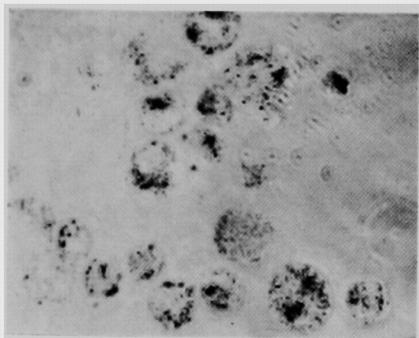
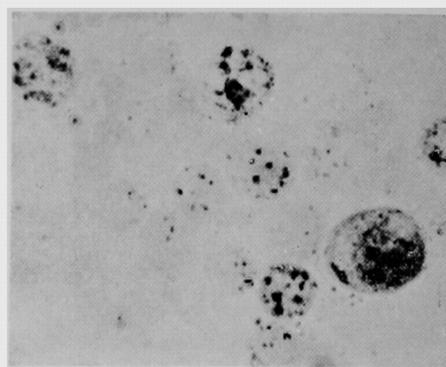
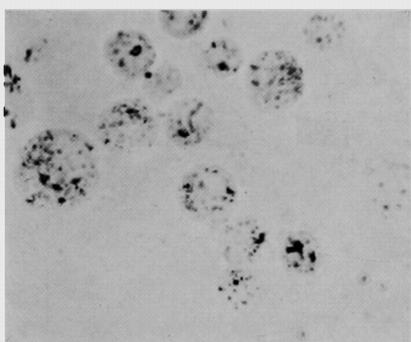
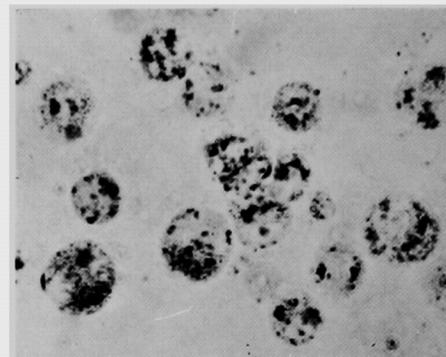
写真 4. a OX₂ 0 時間4. b OX₂ 3 時間写真 5. a OX₃ 0 時間5. b OX₃ 3 時間

写真 6. a OX mix 0 時間



6. b OX mix 3 時間

