



Title	放射線による吉田肉腫細胞界面動電圧の変化の機序について
Author(s)	柴田, 茂
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1963, 22(12), p. 1315-1326
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14749
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

放射線による吉田肉腫細胞界面動電圧の 変化の機序について

北海道大学医学部放射線医学教室（主任 若林重勝教授）

柴 田 茂

(昭和38年1月28日受付)

The mechanism of the changes in electrokinetic potential
of sarcoma cells following x-irradiation

By

Shigeru Shibata

Department of Radiology, School of Medicine,

Hokkaido University, Sapporo, Japan.

(Director: Prof. M. Wakabayashi)

The present paper deals with the mechanism of the changes in electrokinetic potential of sarcoma cells following x-irradiation.

When x-irradiation and agents such as Nitromine, hydrogen dioxide and succinic acid caused the maximum changes and the recovery of electrokinetic potential upon sarcoma cells, the author observed the changes of electrolyte composition in ascites using the measurements of inorganic electrolyte, paperchromatography and infrared spectrum.

The observations may be summarized as follows

1. No difference in Na, K and Cl of inorganic electrolyte of ascites was found due to irradiation.
2. Several free amino acids were detected in sarcoma cells.
3. Irradiation, Nitromine and hydrogen dioxide caused increase of glycine, glutamic acid and threonine, but there was decrease of glutamic acid and threonine caused by succinic acid.
4. The changes in free amino acid of sarcoma cells caused by x-irradiation and agent were also restored to normal when the level in the electrokinetic potential of sarcoma cells recovered normal.
5. The infrared absorption spectra of potassium bromide disk of sarcoma cells were obtained chiefly at $3300\text{ cm}^{-1} \sim 2800\text{ cm}^{-1}$ and $1700\text{ cm}^{-1} \sim 750\text{ cm}^{-1}$.
6. The relative absorbancy indexes at 3300 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} regions were decreased by irradiation, Nitromine and succinic acid.
7. The relative absorbancy indexes at 1550 cm^{-1} and 1530 cm^{-1} regions were increased by irradiation at Nitromine but were decreased by succinic acid.
8. The changes in the electrokinetic potential of sarcoma cells caused by irradiation

and the agents corresponded with the changes of free amino acid and infrared spectra of sarcoma cells at 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} and 1530 cm^{-1} regions.

9. It is suggested that the changes in the electrokinetic potential of sarcoma cells are based on the aberration of intra-cellular metabolism.

10. The changes in free amino acids of sarcoma cells are explained by "feedback inhibition and repression" of amino acid metabolism.

緒 言

遊離細胞の電気泳動的易動度からその細胞膜の界面動電圧を求めることが出来る。この細胞膜の物理化学的性質である界面動電圧は細胞の種類によって異つた値を示す。正常腎細胞と腎腫瘍細胞とでは著しく異なる。即ち、前者では $0.7 \times 10^{-4}\text{ cm/sec/volt/cm}$ で、後者では $1.2 \times 10^{-4}\text{ cm/sec/volt/cm}$ である¹⁾。又吉田肉腫細胞では放射線照射により界面動電圧の著しい変動を来すことは我が教室の吉川、青木等によつて明かにされている。更に、その際、種々の抗腫瘍薬剤によつても肉腫細胞の界面動電圧に著変を来すことが既に報告されている²⁾³⁾。

吉川、青木等によれば放射線照射による界面動電圧の変化の経過は吉田肉腫の核分裂頻度の変化とよく一致すると云う²⁾³⁾。又各種薬剤の影響を見るに、この場合にも、核分裂頻度の経過と界面動電圧のそれがよく一致する。之等の現象は吉田肉腫細胞を *in vivo* で処理した場合であつて試験管内では非常に強力なる処理をしなければ起らない。

以上のことから考えて細胞の界面動電圧の照射による影響は放射線の細胞膜への直接的な作用によるのではなく、照射による体内物質代謝の異常によつて惹起されるものと推測される。そこで、著者はこの点を明かにせんとして吉田肉腫ラットに全身照射をした場合及び各種薬剤（ナイトロミン、過酸化水素、コハク酸）を投与した場合について次の様な実験を行つた。先づ、無機電解質 Na, K, Cl 等の変動を検索し、次いで、各種アミノ酸の態度を追跡、更に蛋白質の変動を測定し、界面動電圧の変化と比較検討した。

実験 I：腹水無機電解質について

実験材料としてピンクアイ系ラット（体重 120

g ~ 150 g）に MTK II 肉腫細胞を移植し、移植後、4 ~ 5 日目の腹水を実験に使用した。教室の先人達によつて肉腫細胞の界面動電圧は生体照射後 1 ~ 3 時間目に最低値を示すこと²⁾が知られているので著者は其の時期即ち、照射後 3 時間目に腹水無機電解質 (Na, K, 及び Cl イオン) を測定した。

方法：10 数頭のラットより腹水を正確に 0.1 cc ずつ採取し、一定量の等張性脱イオングルコース液と脱イオン蒸溜水に注入し、グルコース群は 600 ~ 800 r.p.m. で遠心分離し、一方、蒸溜水群は 3000 r.p.m. で遠心分離する。Na, K, Cl 等の測定に夫々の上澄液の一定量を倍数稀釋して使用する。Na, K は Beckman Flame photometer にて測定し、Cl は Shales und Shales 法にて測定した。本実験では細胞内外電解質の絶対値を求めるのではなく、一定条件下の対照との比較実験であるから、かくすることは許されるであろう。尚照射条件は 180 kVp, 6 mA, 0.9 mm Cu + 1.0 mm Al, 半価層 1.2 mm Cu, 焦点皮膚間距離 20 cm, 線強度 65 r/min., 2000 r 全身一時照射である。

結果：Na⁺ 量（第 1 図）

等張性グルコース処理群の非照射例は 97.8 ±

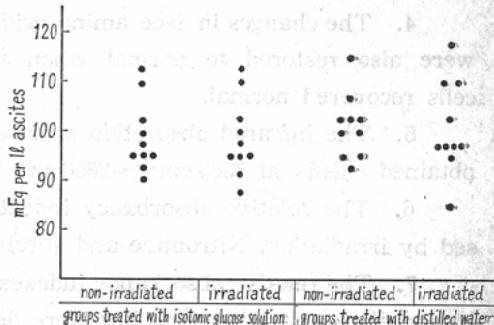


Fig. 1 Sodium in ascites

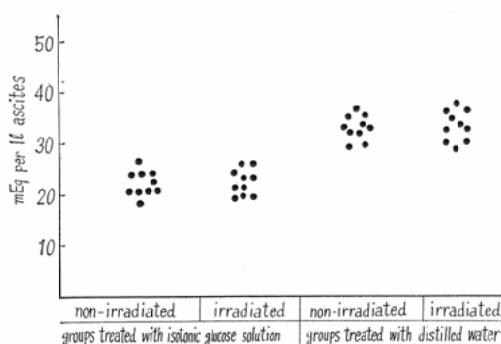


Fig. 2 Potassium in ascites



Fig. 3 Chlorine in ascites

7.50mEq/l ascites であり、照射例では 98.6 ± 7.82 mEq/l ascites であつた。又、蒸溜水処理群の非照射例では 100.6 ± 6.22 mEq/l ascites、照射例では 107.0 ± 11.45 mEq/l ascites であつた。

等張性グルコース処理群と蒸溜水処理群とともに照射による影響は殆んど認められなかつた。

K量（第2図）

等張性グルコース処理群では非照射例 19.8 ± 2.80 mEq/l ascites、照射例 21.4 ± 2.28 mEq/l ascites であつた。又、蒸溜水処理群の非照射例は 31.9 ± 2.22 mEq/l ascites、照射例では 32.8 ± 2.83 mEq/l ascites であつた。

等張性グルコース処理群と蒸溜水処理群とともに照射による変動は認められなかつた。

Cl量（第3図）

等張性グルコース処理群では非照射例 77.6 ± 4.46 mEq/l ascites、照射例 81.3 ± 6.53 mEq/l ascites、蒸溜水処理群では非照射例 81.4 ± 6.64 mEq/l ascites、照射例では 78.3 ± 4.27 mEq/l ascites であつた。

あつた。Cl量についても、等張性グルコース処理群と蒸溜水処理群に照射による変動は認められなかつた。

等張性グルコース処理群の値を蒸溜水処理群の値より差引いた値が肉腫細胞内電解質の値と考えられる。この実験よりKイオンは明かに細胞内に多量存在することが推察される。

この実験結果と放射線による界面動電圧の実験結果を総合すると照射による肉腫細胞の界面動電圧の変動は細胞内外のNa、K及びCl等の無機電解質の消長と一致していない。即ち、肉腫細胞の界面動電圧の変動は無機電解質によるものではなく、肉腫細胞内代謝にともなう有機電解質の変動によるものと推察される。

有機電解質と考えられるアミノ酸について検討した。

実験II：腹水肉腫細胞内遊離アミノ酸について

方法：肉腫細胞移植後5日目のラッテ数匹を用い、凝固阻止剤（蘇酸ソーダー）と等張性グルコース溶液を入れた試験管内に腹水を採取し、直ちに600～800 r.p.m.にて遠心す。この操作を2、3回繰返し、肉腫細胞を洗滌す。洗滌後、正確に2gの沈渣を試験管に取り、蒸溜水を入れ、自家融解防止のため沸とうせる浴槽中に投入す⁴⁾。試験管内を充分攪拌し、細胞を破壊する。その後、乳鉢ですりつぶし、肉腫細胞のホモジネートを作る。純アルコールにてホモジネートから遊離アミノ酸を抽出する⁵⁾。抽出せるアルコール溶液を減圧濃縮し、正確に0.5ccの試料を調製する。この試料の一定量をペイパークロマトグラフィーに展開する。展開溶媒はフェノール—水飽和系及び酢酸—ブチルアルコール—水飽和系溶媒である。展開後、乾燥し、ニンヒドリン試薬で呈色反応を行い、夫々のスポットがアミノ酸であることを確め、移動率を求めた。更に既知標準アミノ酸を同一条件で展開し、試料のスポットの同定を行つた。スポットの大きさ、及び呈色の強弱より肉腫細胞内遊離アミノ酸の変動を追求した（第4図）。

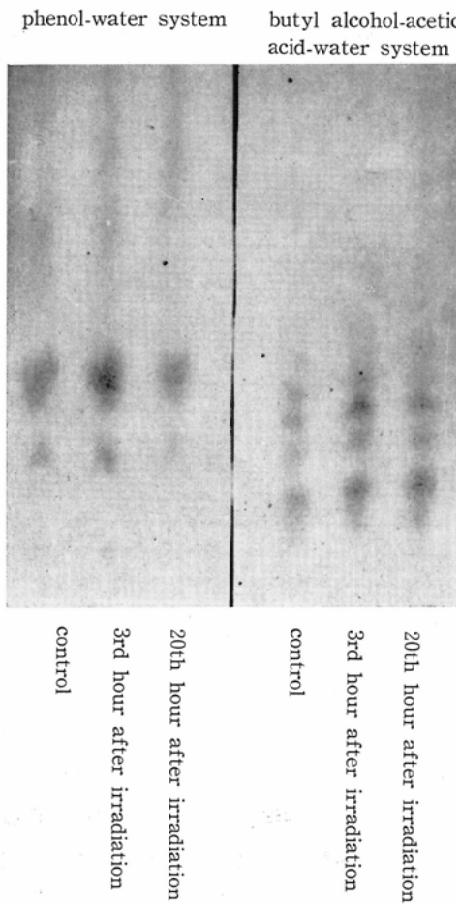


Fig. 4 Paperchromatogram of free amino acids in sarcoma cells

結果：1. 対照（非照射）例の肉腫細胞内遊離アミノ酸はグリシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、アラニン、フェニールアラニン、バリン、プロリン、アルギニン及びロイシン等で、特にグリシン、グルタミン酸等が顕著に認められた。

2. X線照射の影響について前記条件でX線照射し、対照例と比較した。グリシン、グルタミン酸、スレオニン及びアスパラギン酸等に著明なる変動が認められる。

X線照射により肉腫細胞内遊離アミノ酸が変動するので細胞内遊離アミノ酸と界面動電圧といかかる関係にあるかを検討するため下記の実験を試みた。

実験III：肉腫細胞内遊離アミノ酸と界面動電圧との関係

1. ラットに全身X線2000r 照射し、界面動電圧の著しい変化を示す3時間目、及び回復を示す20時間目に腹水を採取し、試料を調製す。

2. ラットにナイトロミン（武田製薬）「0.2 mg/100g」を腹腔内投与し、界面動電圧に著しい変動を与える12時間目、及び回復を示す48時間目に腹水を採取し、試料を調製する。

3. ラットに過酸化水素（薬用分析用、江戸川化学製）「1.5% 1.0cc/100g」を腹腔内投与し、界面動電圧に著しい変動を与える3時間目、回復を示す24時間目に肉腫細胞を採取して試料を調製する。

4. ラットにコハク酸（和光純薬製）「1% 1.0cc/100g」を腹腔内投与し、界面動電圧に変化を与える3時間目、回復の24時間目に腹水を採取し、試料を調製する。

結果：1. X線照射で界面動電圧に著しい変動を与える3時間目にグリシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸、セリン等が著しく増量し、バリンの消失が認められる（第1表）。

Table 1 Free amino acid of sarcomacells irradiated

	control	after the irradiation	
		3rd hour	20th hour
glycine	++	#	++
glutamic acid	++	#	++
threonine	+	#	+
aspartic acid	+	#	+
serine	±	+	±
alanine	+	+	+
phenylalanine	+	+	+
valine	+	-	+
proline	++	+	+
arginine	±	±	±
leucine	±	±	±

(#) very intense (colour and size of the spot)

(+) intense

(++) middle

(+) weak

(±) very weak

(-) vanished

Table 2 Free amino acids of sarcoma cells treated with Nitromine

	control	after the injection	
		12nd hour	48th hour
glycine	++	##	++
glutamic acid	++	##	++
threonine	+	##	+
aspartic acid	+	++	+
serine	±	+	±
alanine	+	##	±
phenylalanine	+	+	+
valine	+	+	+
proline	++	++	++
arginine	±	±	±
leucine	±	±	±

Table 3 Free amino acids of sarcoma cells treated with hydrogen dioxide

	control	after the injection	
		3rd hour	24th hour
glycine	++	##	++
glutamic acid	++	##	++
threonine	+	##	+
aspartic acid	+	+	+
serine	±	+	±
alanine	+	+	+
phenylalanine	+	##	+
valine	+	±	±
proline	++	++	++
arginine	±	±	±
leucine	±	±	±

2. ナイトロミン投与で界面動電圧に著しい変動を与える12時間目にはグリシン、グルタミン酸、セリン、アラニン等が増量し、回復の48時間目には対照に復している（第2表）。

3. 過酸化水素投与で界面動電圧に著しい変動を与える3時間目にグルシン、グルタミン酸、スレオニン、フェニールアラニン等の増量があり、バリンの減少を認める。回復の24時間目には対照群に復している（第3表）。

4. コハク酸投与で界面動電圧に変動を与える3時間目にグルタミン酸、フェニールアラニン、バリンの減少、アラニンの増量が認められる。又

Table 4 Free amino acids of sarcoma cells treated with succinic acid

	control	after the injection	
		3rd hour	24th hour
glycine	++	##	++
glutamic acid	++	+	##
threonine	+	±	+
aspartic acid	+	+	+
serine	±	±	±
alanine	+	##	+
phenylalanine	+	±	+
valine	+	—	+
proline	++	++	++
arginine	±	±	±
leucine	±	±	±

回復を示す24時間目には対照に復している（第4表）。

移植後5日目の腹水肉腫細胞内遊離アミノ酸は略々10数種類見出され、X線照射、ナイトロミン、過酸化水素、コハク酸等によつて界面動電圧に著しい変動を与える時期に遊離アミノ酸のグリシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸等が量的に著しい変動を示し、夫々の界面動電圧の回復時に量的変動を示した遊離アミノ酸は対照群のものに復している。

肉腫細胞の界面動電圧の変動と細胞内遊離アミノ酸の変動と略々平行している。更に之等アミノ酸の由来を追求すると共に蛋白質についても検討するために下記の実験を行つた。

実験IV：肉腫細胞の赤外線吸収について

前記条件で肉腫細胞を採取し、2、3回生理的食塩水にて洗滌す。直ちに凍結乾燥し、乾燥を充分に行い湿気を防止する。乾燥肉腫細胞を200メッシュ以下の臭化カリ粉末と均等に混合する⁵⁾。混合比は0.8%と一定にし肉腫細胞の臭化カリ錠剤の作製を行つた。日立製自記赤外線分光器にて肉腫細胞臭化カリ錠剤の吸収スペクトルの測定を行つた。夫々の錠剤の厚さをミクロメーターで補正し、Bouger-Lambert-Beerの法則⁶⁾より肉腫細胞の各波数における吸収スペクトルの相対的強度を求めた。

$$As = k \cdot c \cdot d = \ln \frac{I_0}{I} \quad As: \text{吸収度}$$

$$\therefore k \cdot c = \frac{As}{d}$$

$k \cdot c$: 相対的強度

k …吸収定数 I_0 …光の強度 ($d = 0$ のとき)
 c …錠剤濃度 I …光の強度 ($d = d$ のとき)
 d …錠剤の厚さ

対照群、X線照射群、ナイトロミン、コハク酸投与群の界面動電圧に夫々著しい変動を与える時期に腹水肉腫細胞を採取し、前記の方法にて錠剤を作製し、吸収スペクトルの測定を行つた。



Fig. 5 Infrared spectra of sarcoma cells (wave number at 3300~2800 cm⁻¹)

— ; control — ; irradiation

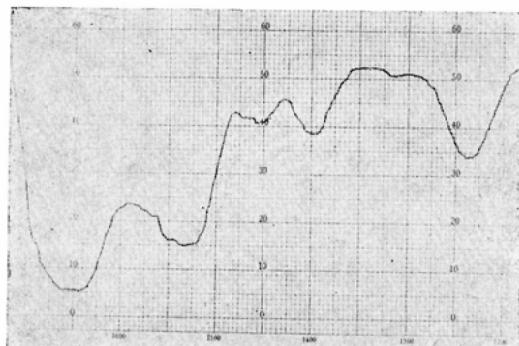


Fig. 6 Infrared spectra of sarcoma cells (wave number at 1700~1200 cm⁻¹)

— ; control — ; irradiation

Table 5 Infrared spectrum of sarcoma cells
(Relative absorbancy index)

wave number cm ⁻¹	control	x-irradiation	Nitromi-ne	succinic acid
3300	1.88	1.67	1.72	1.68
2920	1.11	1.24	1.16	1.23
1650	2.77	2.64	2.62	2.28
1550	1.70	1.77	1.72	1.67
1530	1.76	1.89	1.78	1.75
1455	0.83	0.92	0.88	0.90
1395	0.88	0.93	0.88	0.92
1235	1.00	1.06	1.02	1.03
1085	0.87	0.92	0.88	0.95
965	0.42	0.41	0.40	0.41
780	0.46	0.43	0.41	0.43

結果 1. 対照群の赤外線吸収スペクトル
肉腫細胞は第5、6図の如き赤外線吸収スペクトルを示し、吸収波数は第5表の如くである。各々吸収波数における相対的強度を示してある。特に波数3300~2800cm⁻¹、1700~750cm⁻¹の間に著しい吸収が認められる。

2. X線照射群の赤外線吸収スペクトル

界面動電圧に著しい変動を与える3時間目に採取せるもので、吸収波数は対照群のものと異ならないが、各々吸収波数における相対的強度に差が認められる。波数3300cm⁻¹、2920cm⁻¹、1650cm⁻¹、1530cm⁻¹等が特に著しい。

3. ナイトロミン投与群の赤外線吸収スペクトル

界面動電圧に著しい変動を与える12時間目に採取せるもので、対照群に比し吸収波数に異常を認めないが、各々吸収波数における相対的強度が異つており、特に波数3300cm⁻¹、1650cm⁻¹が顕著である。

4. コハク酸投与群の赤外線吸収スペクトル

界面動電圧に著しい変動を与える3時間目に採取せるもので、吸収波数に異常なく、対照群に比し、波数3300cm⁻¹、2920cm⁻¹、1650cm⁻¹等に相対的強度の差異が認められる。

対照群、X線照射群、ナイトロミン、コハク酸投与群による肉腫細胞の赤外線吸収スペクトルより各波数に於ける相対的強度を Bouger-Lambert-

Beer の法則より計算した。対照群に比し、X線照射群、ナイトロミン、コハク酸投与群は波数 3300cm^{-1} 、 1650cm^{-1} 等の相対的強度に顕著な変動がある。即ち、波数 3300cm^{-1} における対照群の相対的強度は1.88、X線照射群のものは1.67、ナイトロミン投与群のものは1.72、コハク酸投与群のものは1.68であつた。又、波数 1650cm^{-1} における対照群の相対的強度は2.77、X線照射群のものは2.64、ナイトロミン投与群のものでは2.62、コハク酸投与群のものは2.28であつた。波数 3300cm^{-1} 及び 1650cm^{-1} における処理群の相対的強度は対照群 $^{-1}$ に比しいづれも減少している。

界面動電圧の変動は赤外線吸収スペクトルの波数 1550cm^{-1} 、 1530cm^{-1} の対相的強度の変動と平行している。波数 1550cm^{-1} における対照群の相対的強度は1.70、X線照射群のものは1.77、ナイトロミン投与群のものは1.72、コハク酸投与群のものは1.67であつた。波数 1530cm^{-1} においては対照群1.76、X線照射群1.89、ナイトロミン投与群1.78、コハク酸投与群1.75であつた。界面動電圧の上昇を示すコハク酸投与群で波数 1550cm^{-1} 及び 1530cm^{-1} の相対的強度は対照群に比し減少し、X線照射群、ナイトロミン投与群で増加している。

総括及び考按

界面動電圧の発因である細胞内外電位の発生機構に関して現在2つの考え方があり、1つは生体膜を隔てての Donnan 膜平衡が成立して起るものと、他の1つは膜構成物質のもつ物理化学的ポテンシャルの差に従つて発生する場合である。

Hodgkin 等⁷⁾は頭足類巨大神経を用い、微小電極法で膜電位を化学分析及び放射性同位元素分析によって細胞内外イオン濃度を測定した。電位決定イオンは K イオンであり、K、Cl 等イオンは細胞膜を自由に通過しうる。Na イオンは細胞膜を通過せず K イオンが Donnan 膜平衡にあることを示した。放射性同位元素を用いた測定結果より単にイオン透過度の差に帰してしまうわけにはいかなくなり、現在 Na イオンも細胞膜を通過し、細胞内に浸入し、細胞外へ追出されると云われる Na ポンプの概念が生れた⁹⁾。イオンポンプ

が組織代謝と関連を持つであろうことはエネルギー供給源から考えても予想される。Hodgkin 等は生体膜は荷電膜であるために異常透過現象が重要となり、組織代謝に直結した機構が働いていると云つている。組織に代謝毒を与えた後各イオンの変動は今迄受動的拡散のみによると考えられていた K イオンにも変化が現われ、Na イオンとは逆に細胞外より細胞内の移動が減少し、細胞内より細胞外への移行が僅かに増加の傾向を見せており。しかし、これが膜電位の変動や透過度の変化によるものではないことも明らかにされた¹⁰⁾。

$$Er = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_i}{[K]_o} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl]_o}{[Cl]_i}$$

Er…膜内外の電位差

R…気体常数

T…絶対温度

F…フィラデー常数

[K]_i…細胞内 K イオン濃度

[K]_o…細胞外 K イオン濃度

[Cl]_i…細胞内 Cl イオン濃度

[Cl]_o…細胞外 Cl イオン濃度

膜電位は Donnan の式によつて上記の如く示される。Grundfest¹¹⁾によれば細胞膜電位は計算されたものより低い値である。細胞内に 2M-K-glutamate を注入すれば [K]_i だけが増加し、膜電位の増加が予期され、一方、2 M-KCl を細胞内に注入するならば [Cl]_i イオンの増加によつて膜電位の減少が予期されたのであるが、何等膜電位に対して変化は認められなかつた。

従つて膜電位は細胞内外の K イオン及び Cl イオン濃度等の不均一な分布状態による Donnan ポテンシャルではなくして生体膜自体によるものと考えられる。Katz¹²⁾によれば神経や筋肉はエネルギーを用いて定常状態を維持し、細胞内 Na 濃度を保持しつづけている。細胞は外へ拡散し得ない有機イオンを含み、Na イオンの能動的排出と有機陰イオンの蓄積と云う機構が膜における荷電を決定していると考えた。しかし、照射による電解質 Na、K 及び Cl イオン濃度の変動について現在まで数多く報告されているが一致したものはない。試験管内で赤血球を 20kr 照射すると血球内 K

濃度が減少すると報告しているが¹³⁾一方、ラッテの前足に局所線量36.9kr~73.4kr 照射するも細胞内K濃度の変動を認めないと報告している¹⁴⁾。腹水肉腫細胞内外のNa, K 及びClイオン濃度について著者は測定したがX線照射による変動を認めなかつた。

このようなことよりX線照射による界面動電圧の変動はNa, K, Cl等の無機電解質による変動とは考えられず、細胞内エネルギー代謝による有機電解質の変動が考えられる。

有機電解質として考えられる細胞内遊離アミノ酸の変動をペーパークロマトグラフィーにて追求した。

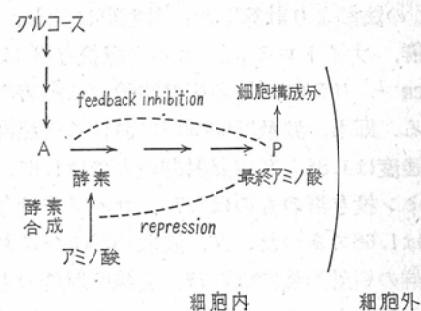
対照群では肉腫細胞内遊離アミノ酸は大略10数種類見出された。

X線照射により界面動電圧に著しい変動を与える時期の細胞内遊離アミノ酸は顕著に変動している。グリシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸及びセリンの増量があり、バリンの消失が認められる。

ナイトロミン投与ではグリシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸、セリン、アラニン等の増量が認められる。

過酸化水素ではグリシン、グルタミン酸、トレオニン、フェニールアラニンの増量がありバリンの減少が認められる。

界面動電圧の回復時には遊離アミノ酸は殆んど正常に復している。ナイトロン及び過酸化水素による遊離アミノ酸の変動は略々X線照射による変動と一致している：一方、やや界面動電圧が上昇するコハク酸投与ではグルタミン酸、フェニールアラニン、バリンの僅かな減少があり、軽度のアラニンの増量が認められ、界面動電圧と細胞内遊離アミノ酸との変動はほぼ一致している。しかし、コハク酸によるアミノ酸の量的変動は作用機構の点より夫々異なるものと考えられる。形態学的にX線、ナイトロミンは主として拡張に作用し、他方、過酸化水素は細胞質に作用すると言われている¹⁵⁾¹⁶⁾。又、生化学的にX線、ナイトロミン、過酸化水素等の細胞代謝過程に及ぼす作用も



附 I. feedback inhibition と repression³⁴⁾ (Umbarger)
異なることが最終産物であるアミノ酸の種類の変動より推察される。

細胞内アミノ酸代謝調節について Umbarger³³⁾等が明らかにした。「反応系の最終産物である低分子物質による酵素合成系の抑制及びその反応系の初期段階の酵素反応の阻害現象がある。いずれも最終産物が過剰に生成されるか又は、外部から与えられた際にその合成を調節する機構である。」所謂 Repression と Feedback inhibition である(附 I.)。

アミノ酸は蛋白質、核質の構成分或は中間体であり、正常代謝では一般に量的均衡を保つて制限された状態で生合成される。このため Repression と Feedback inhibition による代謝調整が行われて、これらの中間代謝物の過剰生産を調整しているものと思われる。過剰に生成されることは代謝調整機構の異常化が行われているものと解釋される。例えばナイアシンを含まない9%カゼイン飼料に少量のメチオニンを補足した場合、少量のスレオニンを添加するとラッテの成長が著しく低下し、更にトリプトファンかナイアシンを加えることによつて回復する。即ちスレオニンの添加によつてトリプトファンの要求量が増大することになる。必須アミノ酸を過剰に与えると程度の差こそあれ、害作用を有している。この害作用はある種のアミノ酸の添加で軽減される¹⁷⁾。

所謂、アミノ酸の過剰による毒性である。アミノ酸合成系では反応系の何處かに損傷を受けない限り中間代謝物を蓄積することは殆どなく、細胞内の代謝プールに見出されるのは最終産物である蛋白合成アミノ酸のみである¹⁸⁾。アミノ酸の異

常蓄積が起るのは何らかの理由によって細胞内代謝調整機能が打ち破られていると解される。代謝障害細胞による代謝生産物の蓄積例は損傷箇所に先行する中間物が蓄積される例が多い。

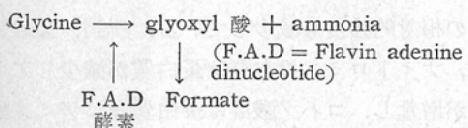
X線照射により核質に変化が認められるが網状赤血球を用い核質を除くことにより原形質の蛋白質及びRNAへのアミノ酸の移行が急激なる抑制を示す¹⁹⁾。又、腹水肉腫細胞に対して照射後2時間目にDNA, RNA等への¹⁴C-グリシンの移行が非照射群の70%に減少しているのを認めた²⁰⁾。

しかし、Butler, Cohen 等は¹⁴C-フェニールアラニンを投与し、肝分画に対する照射の影響を追求し、肝細胞蛋白質に¹⁴C-フェニールアラニン取り込みが増大していることを示した。一方、腎、脾、血液等にはこの現象を認めなかつた²¹⁾。

モルモットの皮膚に ^{90}Sr の β 線照射を行い、表皮の遊離アミノ酸を定量し、著しい増加を認めている²²⁾。これは葡萄状球菌に抗生物質を投与し、蛋白質合成を抑制し各種アミノ酸が蓄積する現象と類似している²³⁾。

生体照射により動物の腸、肝等のアセト酢酸、乳酸、焦性葡萄糖等の変動は非照射群と比して著明なる変動はないが、肉腫細胞ではアセト酢酸、乳酸、焦性葡萄糖等の変動が2時間目以内に認められる²⁴⁾。これは肉腫細胞のTCA回路の障害を示すものである。今回の実験では肉腫細胞内遊離アミノ酸は著しい変動を示しており、遊離アミノ酸の增量を認める。前述の肉腫細胞TCA回路障害と同じくアミノ酸代謝は最終的にTCA回路に介入するものであり、他方、アミノ酸は生成経路の分岐や、あるアミノ酸が他の先駆体になるなど複雑な相互関係を有している。従つてこの場合アミノ酸代謝に限つて論ずることは困難である。

グリシンは下記の如き代謝経路をたどることが知られている²⁵⁾。



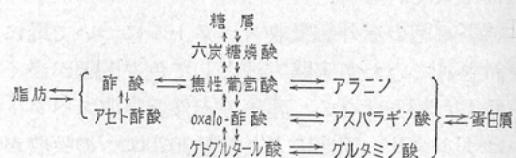
この反応は照射、抗腫瘍剤により右側に進行せずグリシンが蓄積すると考えられる。FAD酵素

の障害即ち Repression が考えられる。



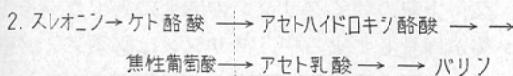
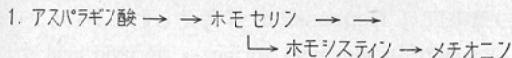
又、上記の如くグリシンの增量にともないセリン等が増量して来る²⁵⁾。グリシンは必須アミノ酸ではなく蛋白質異化作用によつて生ずるものであると考えられ、その起源については不明である。更にグリシンは解毒反応にあすかり核酸、蛋白質に取り込まれる。本実験でグリシンの增量を見たことは照射、抗腫瘍剤等によりこの取り込みが抑制されると考えられる。

グルタミン酸はグルタミン酸脱水素酵素により α -ケトグルタル酸を生じ、これがアミノ転移に関係する。又、多くの生化学的反応に関与しグルタミン酸生合成の主経路はTCA回路に基盤を置いている。照射により肉腫細胞のTCA回路基質の増量があり、TCA回路の障害が認められる²⁴⁾。グルタミン酸の蓄積は α -ケトグルタル酸又はグルタミン酸の酸化ないし分解をもたないことを示している。照射、抗腫瘍剤等によつてグルタミン酸系経路が阻害されグルタミン酸が蓄積してくる。又、アスパラギン酸、アラニン等も比較的代謝中心部位アミノ酸でありアミノ転移に関係し照射、薬剤で変動が現われて来るものと考えられる。これらアミノ酸は必須アミノ酸ではなく種々の前駆体より生合成されて來るので Feedback inhibition及びRepression等の障害によりこれらアミノ酸の蓄積するものと解釋される(附Ⅲ)。



附 II. 糖質、脂肪、蛋白質代謝経路²⁵⁾

スレオニンについても Feedback inhibition と Repression の作用が観察される。酵母は 20 mM 濃度のスレルニンで生育が遅くなるが、5 mM 濃度のメチオニン添加により回復する。酵素のアスペラギナーゼはスレオニンによって Repression と Feedback inhibition を受けるため共通の前駆体である Homoserine の合成が抑えられ、その結果メチオニン欠乏を起こすとの考え方²⁶⁾



附Ⅲ. アミノ酸の生合成経路⁸⁾

(附Ⅱ). 照射、過酸化水素投与によってバリンの消失及び減少がスレオニンと関連し Feedback inhibition 及び Repression の障害のために起きると考えられる(附Ⅱ)。

X線照射、抗腫瘍剤投与等による肉腫細胞内遊離アミノ酸の変動は代謝障害を起し、中間代謝産物としアミノ酸の蓄積が生ずる。アミノ酸の蓄積は肉腫細胞内代謝の Feedback inhibition 及び Repression の障害を示すものと云えよう。然もこの障害が肉腫細胞の界面動電圧の変動とよく対応しているのである。

Potter の仮説によれば動物細胞内アミノ酸、核質の分解産物がその前駆物質の生成に關係する酵素活性を抑制するので(Feedback 機構)細胞内へ異化産物を入れれば腫瘍の生長は抑制され、従つて腫瘍細胞増殖の阻止剤として核酸、アミノ酸の分解産物を研究すべきであると述べている²⁷⁾。又、Allison は担癌動物にメチオニンを添加し正常な組織の増殖は盛んになるが腫瘍細胞の増殖は低下することを認め、アミノ酸代謝の Feedback inhibition 及び Respession を応用した分野が拡げて来ている²⁸⁾。

腫瘍細胞の赤外線吸収スペクトルについて既に検討されていたが実験方法として色々問題が多く一致した報告はない。乳癌の赤外線吸収スペクトルはホルマリン固定により波数3070cm⁻¹の吸収が認められたが、凍結乾燥ではこの吸収は認められなかつた。しかし乳癌組織は普通の乳腺組織より波数1075cm⁻¹の吸収が比較的強いことが認められている²⁹⁾。

著者は凍結乾燥せる肉腫細胞で臭化カリ錠剤を作製し、対照、X線照射、ナイトロミン、コハク酸投与によって波数1550cm⁻¹、1530cm⁻¹に興味ある吸収を認めそれぞれの相対的強度は肉腫細胞の界面動電圧の変動と一致した変化を示すことを

知つた。現在赤外線吸収スペクトルの帰属が行われ、アミノ酸について種々の報告がある。アミノ酸は波数1580～1610cm⁻¹の強い吸収(—COO⁻)、波数2100cm⁻¹附近の(NH⁺³)による吸収、波数1550～1530cm⁻¹位置に現われる吸収が特徴と言われている。一方蛋白質の特性吸収スペクトルは波数3300cm⁻¹、1650cm⁻¹、1550cm⁻¹と言われ、波数1550cm⁻¹の吸収スペクトルの帰属については尙種々議論がある³⁰⁾。著者の実験で波数3300cm⁻¹、1650cm⁻¹、1550cm⁻¹、1530cm⁻¹の吸収スペクトルを認めた。このことは肉腫細胞には蛋白質、アミノ酸等の吸収のあることを示し、波数1550cm⁻¹、1530cm⁻¹は蛋白質の末端アミノ酸及び細胞内遊離アミノ酸の吸収と考えられる。肉腫細胞の界面動電圧が低下する際肉腫細胞のアミノ酸は增量し、実験Ⅲの結果と一致している。

肉腫細胞の赤外線吸収スペクトルより細胞の核酸等について議論すべきであるが、その吸収スペクトルの帰属については不明の点が余りに多く、解説が困難である。一方 Schwarz³¹⁾によれば脳組織及び脳組織より抽出した脂質について赤外線吸収スペクトルを測定し、成長した脳組織と成長しつつある脳組織との間に相違を認め、吸収の比が変化し、X線照射前後の脳組織についても同様であることを報告した。又 Schwarz³²⁾は成長した家兎の肝臓と家兎の胎児の肝臓ではX線照射により波数1040cm⁻¹の位置に変動が現われることを報告している。著者の実験でもX線照射、ナイトロミン、コハク酸投与により赤外線吸収スペクトルの相対的強度が夫々変化し、対照群と比較X線照射群、ナイトロミン投与群では波数3300cm⁻¹、1650cm⁻¹の相対的強度が減少し、波数1550cm⁻¹、1530cm⁻¹の相対的強度が増加している。又、コハク酸投与群では波数3300cm⁻¹、1650cm⁻¹の相対的強度は減少し、更に波数1550cm⁻¹、1530cm⁻¹の相対的強度も減少している。所謂、X線照射群、ナイトロミン投与群は蛋白質が減少しアミノ酸が增量し、コハク酸群は蛋白質及びアミノ酸が減少している。

肉腫細胞の界面動電圧の変動を細胞内蛋白質、

アミノ酸等の変動と比較すれば界面動電圧の低下は肉腫細胞の蛋白質の減少及びアミノ酸の増加であり、他方、界面動電圧の上昇は蛋白質、アミノ酸の減少と一致している。これらの変動は肉腫細胞の生活機能を反映するものである。界面動電圧の変動は実験結果より細胞内有機電解質代謝による変動と考えられる。

結論

- 照射により腹水肉腫細胞の界面動電圧に著しい変動を与える時期の細胞内外電解質 Na^+ , K^+ 及び Cl^- イオン濃度は殆んど変動していない。

- 移植後5日目の腹水肉腫細胞内遊離アミノ酸は大略10種類認められた。

- X線照射、ナイトロミン、過酸化水素、コハク酸等によつて界面動電圧に著しい変動を与える時期に種々の細胞内遊離アミノ酸は量的に著明なる変動を示している。X線照射、ナイトロミン、過酸化水素等により主としてグリシン、グルタミン酸、スレオニン等の増加、コハク酸によるグルタミン酸、スレオニンの減少を認める。

- 界面動電圧の回復期には、肉腫細胞内遊離アミノ酸は処置前値に復している。

- 肉腫細胞の赤外線吸収で波数 $3300\text{~}700\text{~cm}^{-1}$ の間に吸収が認められ、特に波数 $3300\text{~}2800\text{~cm}^{-1}$ 及び $1700\text{~}750\text{~cm}^{-1}$ の間に顕著な吸収が認められる。

- X線照射、ナイトロミン投与後界面動電圧に著しい変化を与える時期の肉腫細胞赤外線吸収で波数 3300~cm^{-1} 及び 1650~cm^{-1} の相対的強度が減少し、波数 1550~cm^{-1} , 1530~cm^{-1} の相対的強度は増加している。

- コハク酸投与後界面動電圧に変動を与える時期の肉腫細胞赤外線吸収で波数 3300~cm^{-1} , 1650~cm^{-1} の相対的強度は減少し、波数 1550~cm^{-1} , 1530~cm^{-1} の相対的強度も減少している。

- 界面動電圧の変動は肉腫細胞の遊離アミノ酸の変動及び赤外線吸収波数の相対的強度変動と一致する。

- 肉腫細胞の界面動電圧の変動は細胞内代謝の異常に基づくことが推察される。

- 肉腫細胞内遊離アミノ酸の変動は細胞内アミノ酸代謝の Feedback inhibition 及び Repression 機構によつて説明される。

(擲筆するに当り、御尽力下さつた北大理学部動物教室佐藤博士、及び北大工学部応用化学教室横山博士に深く謝意を表わします。また終始、御教示、御助力を賜つた当教室入江講師、並びに教室員各位に厚く感謝します。)

本研究は文部省科学研究費に依つた。附記して感謝の意を表します。

本論文要旨は日本医学放射線学会第20回総会(大阪)昭和36年4月、並びに第21回(名古屋)総会昭和37年4月に発表した。

文 献

- J.E. Ambrose, A.M. James, J.H.B.: Nature. 177, 576(1956). —2) 吉川秋雄: 日本医学会誌, 19, 538(1959). —3) 青木金亮: 日本医学会誌, 20, 964, (1960). —4) P.E. Schurr et al: J. Biol. Chem. 182, 29(1950). —5) M.M. Stimson: J. Am. Chem. Soc. 74, 1805 (1952). —6) 中原一郎: 生体物理化学シンポジウム第五集p. 3(1960). —7) A.L. Hodgkin: Biol. Rev. 26, 339 (1951). —8) 渡辺泰: 蛋白質、核酸、酵素, 7, 497 (1962). —9) H.H. Ussing: Physiol. Rev. 29, 127 (1949). —10) A.L. Hodgkin, R.D. Keynes: J. Physiol. 128, 58 (1955). —11) H. Grundfest: J. Gen. Physiol. 38, 245 (1954). —12) B. Katz: Symposia. Soc. Exptl. Biol. IV 16 (1952). —13) C.W. Sheppard: J. Gen. Physiol. 34, 691 (1950). —14) W.S. Wilde, C.W. Sheppard: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 88, 249 (1955). —15) 本永熏: 日本医学会誌, 19, 759 (1959). —16) 舟山秀: 日本医学会誌, 19, 2146 (1960). —17) A.E. Harper: Ann. New York Acad. Sci. 69, 1025 (1958). —18) P.H. Abelson, H.J. Vogel: J. Biol. Chem. 213, 355 (1955). —19) J. Brachet: Ionizing Radiations and cell metabolism(ed Wolstenholme) London, 1956. J & A Churchill LTD p. 18. —20) A. Forssberg: Ionizing Radiations and cell metabolism (ed Wolstenholme), London, 1956 J & A Churchill LTD p. 219. —21) J.A. Butler, P. Cohn, A.R. Crathorn: Advances in Radiobiology, London, 1956, Oliver and Boyd. p. 33. —22) J. Tabachnik, C. Weiss: Radiation Research 11, 684 (1959). —23) E.F. Gale: Ionizing Radiations and cell metabolism (ed Wolstenholme), London, 1956, J & A Churchill LTD p. 174. —24) A. Forssberg: Ionizing Radiations and cell metabolism(ed Wolstenholme), London, 1956, J & A

Churchill LTD p. 219. —25) B. Harrow: Text-book of Biochemistry. New York 1954, W.B. Saunders Company. p. 253~ 254. —26) E.R. Stadtman: J. Biol. Chem. 236, 2033 (1961). —27) V.R. Potter: Cancer Research 16, 685 (1956). —28) J.B. Allison: In some aspects of amino acid supplementation, Rutgers University Press, 1956, New Brunswick. N.J. —29) E.R. Blo-

ut, R.C. Mellors: Science 110, 137 (1949). —30) 千原呉郎: 赤外線吸収スペクトル(化学の領域) 増刊31, p. 45~50. —31) H.P. Schwarz, H.E. Riggs et al.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 80, 467 (1952). —32) H.P. Schwarz, H.E. Riggs et al.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 85, 96 (1954). —33) H.E. Umbarger, B. Brown: J. Biol. Chem. 233, 415(1958).