

Title	Phleum pratense L. の種子に対する放射線の作用 : 電子スピン共鳴により見た遊離基の消長と生物学的効果との関連性について
Author(s)	佐藤, 匡
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1965, 25(4), p. 251-256
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14923
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Phleum pratense L. の種子に対する放射線の作用

—電子スピン共鳴により見た遊離基の消長と

生物学的効果との関連性について—

札幌医科大学放射線医学教室 (主任 牟田信義教授)

佐藤 匡

(昭和40年2月24日受付)

Effects of Radiation on Seeds of *Phleum pratense* L.
—Relation between electron spin resonance concentration
and radiobiological effects—

By

Tadashi Sato

Department of Radiology, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. Nobuyoshi Muta)

Dormant seeds of *Phleum pratense* L. were exposed to X-ray and γ -ray irradiation. Germination tests were conducted immediately after and at irregular specified intervals following storage in the room temperature.

The radiation damage in terms of germinating rate and seedling height on the 15th day was measured and studied.

The X-rays applied were 200 kVp, 25 mA, with 2 mm Al filtration, h.v.l. 0.56 mm Cu; the focus-seed-distance was 17 cm, and the dose rate was 770 r/min. The γ -rays were generated by ^{60}Co , and the dose rate was 900 r/min.

The germinating percentage showed no change up to 50,000 r.

The seeds germinated immediately after irradiation showed reduction in seedling height from 5,000 r and the maximal effect was reached at about 20,000 r (Fig. 4). The damage increased with the time of storage following irradiation for a period up to 1 month (Figs. 4, 5).

The water content of the seeds showed a definite influence on the radiosensitivity. The seedling height was least affected around a 17% of water content while an increase in damage was seen at lesser or larger water contents (Fig. 6).

Free radicals were revealed by E.S.R. even in seeds irradiated with 5,000 r, but the resonance spectra showed almost no change up to 100,000 r, and/or in the seeds examined soon after irradiation or stored for periods up to 1 month in room temperature or in dry-ice ether (Figs. 7, 8, 9).

Any relation was not able to see between the E.S.R. concentration and the radiobiological effects.

I 緒 言

放射線の生物学的作用を解明する一手段として近年、電子スピン共鳴¹⁾(以下 E.S.R. と略す)現象を用いようとする試みがある。電離放射線の照射によつて生ずる遊離基が生物学的に重要な働きをすることは明らかであり、その消長は放射線の生物学的作用の大きさに直接関係するものと考えられる。従つて照射された生物体に生ずる遊離基の測定によつて終極的な生物学的効果に至る過程の解明がある程度なされるのではないかという期待が持たれている。

植物の種子に対する放射線の影響を調べた研究がみられるが^{2,3,4,5)}、これらによると水分、酸素、貯蔵期間、湿度等種々の条件によつて放射線の影響の強さが異なる。その違いの原因が照射によつて種子内に生ずる遊離基の消滅と関係があるのではないかと考えられる。

私はおおあわがえり (*Phleum pratense* L. 一名絹糸草)の種子を用い、その発芽、生育に対する照射の影響と E.S.R. による遊離基の測定を行い両者の関連性を調べた。

II 実験方法

おおあわがえりの種子は市販のもので、発芽率90%以上のものを用いた。種子の大きさにより生

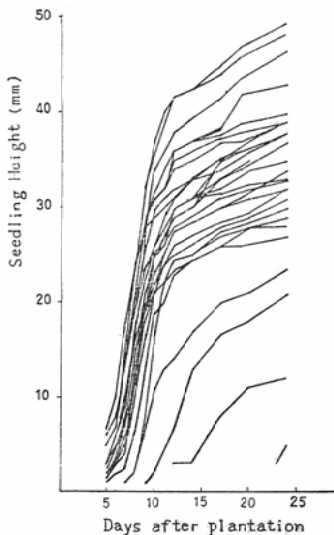


Fig. 1 Growth of seedlings.

育の程度が異なるので、一辺 0.7mmの正方形のフルイの目を通らないものだけを用いた。陶器の皿の上に脱脂綿を敷きその上に種子を並べて水道水を注入し、散光と白色蛍光灯の下で発芽、生育を行つた。播種後5日頃いつせいに発芽しその後急速に生育するが、10日目頃から発育速度は遅くなる(第1図)。播種後15日目に発芽率と生長率を調べた。以下同一条件での種子の発芽生長の測定にはそれぞれ200粒以上の種子を用いた。生長率は無処理種子群の生育の高さの平均に対する照射群の高さの平均の比を百分率で表わした。

種子の水分含量の違いによつて照射による影響が変わるかどうかを調べる為、乾燥した種子及び湿つた種子を用いたが、それには試験管中に種子を入れ、これを200gの五酸化リンを入れた500ccの瓶中に3~60日間保存して乾燥種子をつくり、又湿つた種子はシャーレ中に水を含んだ脱脂綿を敷きその上に種子を入れた皿をのせてシャーレを密閉し1~5日間放置してつくつた。種子の水分含量は乾熱器中で100°Cで2時間置いて重量の減少から計算した。こうして水分含量2.9%から32.3%迄の種子をつくつた。室内放置の場合種子の水分含量は13~15%であつた。このように色々な水分含量の種子に対しエックス線で15,000 r照射した後直ちに播種した。そしてそれぞれの水分含量の種子について、照射しないもの高さの平均に対する照射したもの高さの平均の比を播種後15日目に測定した。

エックス線の照射条件は管電圧200kVp、管電流25mA、濾過板2.0mmAl、半価層0.56mmCu、焦点種子間距離17cm、線量率770r/min.である。⁶⁰Coによる照射は100,000 rについてののみ行い壁の厚さ5mmの蠟の容器に入れて線源から10cmのところを線量率900r/min、111分を要して照射した。線源は468cである。

E.S.R.の測定は北海道大学理学部高分子教室の御厚意で使用させて頂いた日本電子光学製のもので、周波数9417Mc、modulation 9.8 gaussである。測定に供する種子は乳鉢ですりつぶし外殻を取除いからその200mgをガラス管中に封入し

た。ガラス管はハリオで内径 3.8mm 壁の厚さは 0.2mm. そのままでは不対電子を持っていないが、照射されると不対電子を生ずる。それでエックス線照射の際はこのガラス管の一端に種子を集めてこの部分だけを照射し、測定の際は反対側の照射されていないガラス管の部分に種子を集めて測定した。⁶⁰Co の照射では種子は照射してからガラス管に封入した。試料は照射後直ちに上記教室に運んで測定したが、照射後測定迄約 1 時間を要した。試料の一部は照射後測定迄の間、ドライアイス・エーテル中に保存した。

III 実験結果

発芽率はエックス線による 50,000 r 照射以下では差を認めない。照射後 1 週間及び 1 カ月経つてから播種しても同様である (第 2 図)。

照射直後播種では 5,000r から生長の障害がみられ、線量の増加と共にその程度は次第に大きくなる。又、照射後播種迄の時間が長い程生長率は低下するが (第 1 表, 第 3, 4 図), その影響は

Table 1 Dose-effect relationship for stored and immediately planted seeds (%).
(April 21, 1961)

	0	2,500	5,000	7,500	10,000	12,500	15,000	20,000	30,000r
Planted immediately after irradiation with X-ray	100	96.4	93.5	76.8	63.4	35.8	29.1	18.9	18.6
Stored for 7 days after irradiation with X-ray	100	89.0	84.8	54.4	36.1	33.1	23.7	18.8	17.4
Stored for 1 month after irradiation with X-ray	100	90.5	71.8	45.1	33.5	21.4	18.6	17.6	16.8

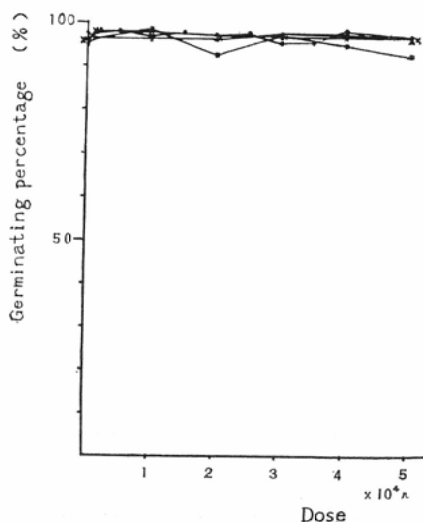


Fig. 2 Percentage of germination at each irradiated dose.

- immediately after irradiation,
- stored for 7 days,
- ▲—▲ stored for 15 days,
- ×—× stored for 1 month.

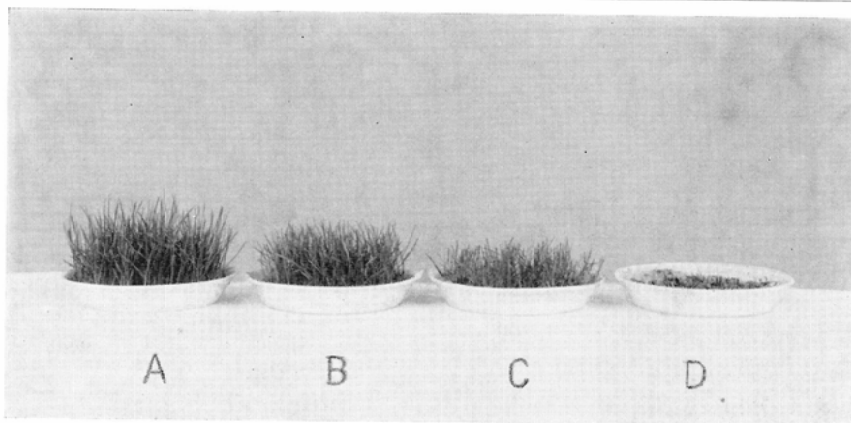


Fig. 3 The photograph shows fifteen-day-old seedlings of *Phleum pratense* L. The seeds were germinated immediately after irradiation with X-ray. A, control (no treatment); B, irradiated with 5,000r; C, 10,000r; D, 20,000 r.

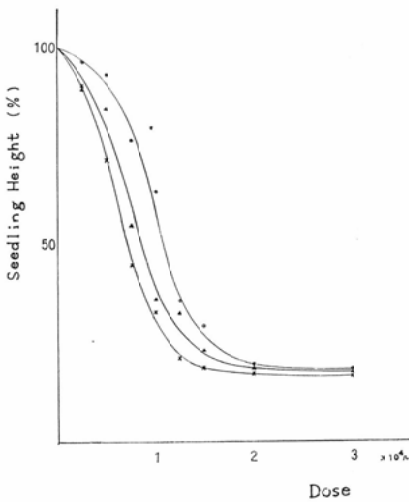


Fig. 4 Dose-effect relationship for stored and immediately planted seeds. ○—○ planted immediately after irradiation, △—△ stored for 7 days after irradiation, ×—× stored for 1 month after irradiation. (April 21, 1961)

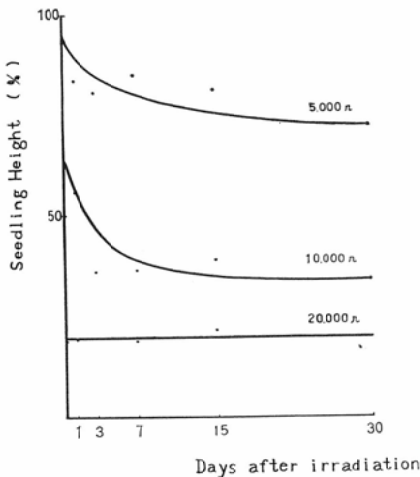


Fig. 5 Influence of storage up to 1 month on the growth of irradiated seeds. (April 21, 1961)

ある程度強い障害の見られる中等線量の 10,000 r あたりではつきり見られるが、20,000 r では障害が極限に達するので貯蔵効果は見られない (第5図)。

水分含量の異つた種子に 15,000 r 照射したものでは生育障害の程度が異なる。即ち水分含量17

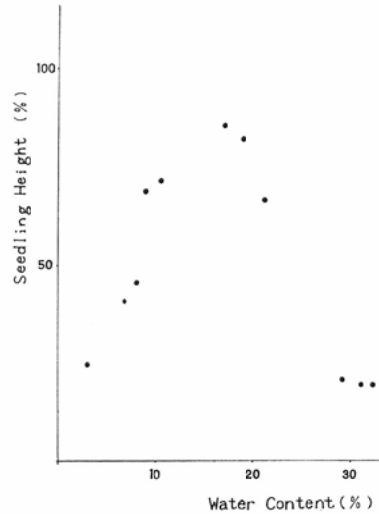


Fig. 6 Relation between seedling height and water content of seeds planted immediately after irradiation with 15,000r of X-ray. (May 30, 1964)

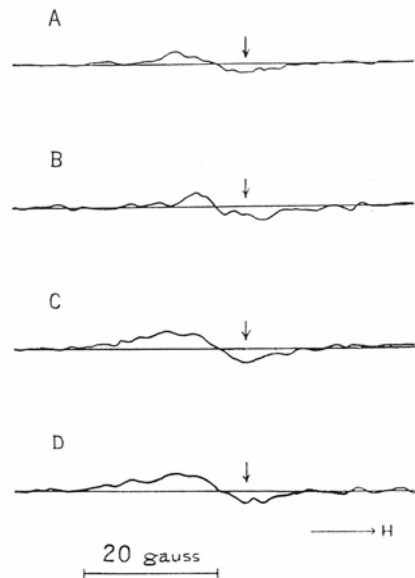


Fig. 7 E.S.R. spectrum of seeds at one hour after irradiation. A: 5,000r, B: 10,000r, C: 20,000r, D: 100,000r. The arrows indicate where resonance of DPPH occur.

%附近で照射の影響が少く、これにより少い水分含量でも、又多い場合でも照射の影響は増大し生育の障害が強まる (第6図)。

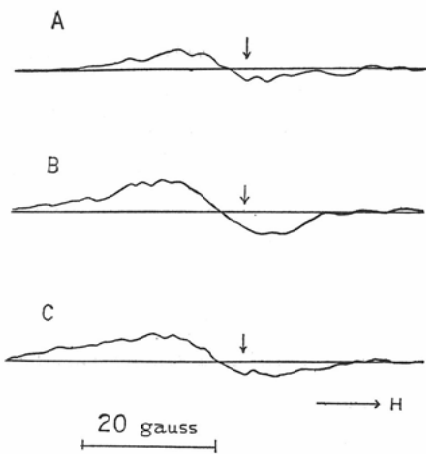


Fig. 8 The E.S.R. spectrum of seeds after 100,000r irradiation. A: stored at room temperature for one hour after irradiation. B: stored in dry-ice ether for one hour after irradiation. C: stored in dry-ice ether for six hours after irradiation.

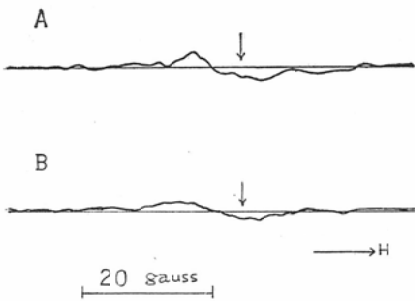


Fig. 9 Comparison of the E.S.R. of seeds irradiated with 10,000r and stored for one hour or one month. A: one hour, B: one month.

E.S.R. 吸収の波形は第7, 8, 9図に示す通りである。5,000 r 照射で遊離基の存在が認められるが、100,000 r でも大差は認められない。又100,000 r 照射直後ドライアイスに入れて測定迄1時間保存したものでも大差はなく、10,000r 照射後25日間室温に放置したものでも、又水分含量8.2%100,000 r 照射後1時間ドライアイス・エーテル中に保存したのも同様であった。

IV 考 察

現在迄の報告をみると植物の種子については照

射線量が多い程生ずる遊離基の量は多く、播種迄の貯蔵期間が長い程その消滅が大であり、又水分含量が少いと消滅の程度は少くなっている⁶⁾⁷⁾。これらの遊離基の生成及び消滅の量的変化は、ある程度放射線の生物学的効果と関連性がありそうに思われるし、照射効果を説明するのに好都合である。もし照射によって生ずる遊離基を定性的にも定量的にもそして時間的推移からも正確に測定し得るならば、放射線の照射という物理的な現象から生物学的効果に至るこの間の過程が化学的な面から明らかにされるものと思われる。

おおあわがえりの種子を使つた以上の実験成績をみると、生育の阻害は30,000 r 以下で照射線量と明らかに相関がみられるし、30日迄の貯蔵期間内で貯蔵と生育阻害との間に関連が認められる。これらの事実は前述した遊離基の生成と消滅の過程から説明できるかもしれない。種子の水分含量の違いによる照射の影響については二通りの考え方によつて説明が可能であるかもしれない。その一つは生成された遊離基の消滅過程からであり、他は細胞活性からである。水分含量の少ない種子では照射によつて生じた遊離基が水と結合して不活性化する機会が少く生物学的に重要な種子の分子と結合する。一方水分含量の多いものでは遊離基の不活性化がocこりやすい⁷⁾。しかしある程度以上水分が多くなると種子は発芽準備状態となつて細胞活性が高まり放射線の影響を強く受けるようになる。水分含量の多い種子での照射の影響の増大は、遊離基の不活性化による照射の影響の低下よりも細胞の活性化によつて放射線に対する感受性が増大する事の方がより大きい為、結果的に生育阻害が強くあらわれるものと思われる。

照射によつて種子に遊離基が産生されることは明らかであるが、その量的な変化を問題にできる程多くはない。これは生物学的な影響を来たす遊離基が非常に短寿命の為照射中あるいは照射後測定迄の期間内に消滅してしまう為かもしれない。又、装置の感度も問題であるが、この測定装置では α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl を用いて 10^{14} 個以上のスピンの数が測定可能であつたが、これ以上

の感度上昇は差し当つて不可能であり従つて前述の照射及び測定方法では遊離基の量的差異をみる事ができなかつた。

おおあわがえりの種子については 20,000 r 以下の照射で明らかな生育阻害現象が観察されるが、これと照射によつて種子に生ずる遊離基との間に量的な関連性があるかどうかを調べたが明らかではなかつた。

V 総 括

おおあわがえりの種子にエックス線又は⁶⁰Co γ線を照射して、種子の発芽、生育に対する影響を調べ、又 E.S.R. による遊離基の測定を行つて両者の関連性を調べた。

エックス線 50,000 r 以下の照射では、直後、1 週間後及び 1 カ月後に播種しても発芽率に影響を与えない。生長の阻害は照射直後播種では 5,000 r からあらわれ線量の増加と共に強まる。播種迄の時間が長い程生長率は低下するが、その影響は 10,000 r あたりではつきりみられるが 20,000 r 以上では貯蔵効果はみられない。種子の水分含量の違いによつて照射の影響が異なる。15,000 r 照射して生育阻害をみると、水分含量 17% 附近で照射の影響が少く、これより少い水分含量でも、又多い場合でも生育阻害は強くなる。

E.S.R. については 5,000 r 照射で遊離基の存在が認められるが 100,000 r 照射でも大差はない。100,000 r 照射直後ドライアイス・エーテルに入れて測定迄 1 時間保存したもので大差はな

く、10,000 r 照射 25 日後のものについても同様であつた。以上の実験成績から、おおあわがえりの種子はエックス線の照射によつて発芽後の生長が阻害されるが、その強さは、種子の水分含量、照射後の貯蔵期間によつても左右される。E.S.R. の測定結果からこれらの生育阻害効果と遊離基の量的、時間的推移の間に明らかな関係を見出す事ができなかつた。

文 献

- 1) Wyard, S.J.: Electron Spin Resonance Spectroscopy. Tools of Biological Research edit. by Atkins, H.J.B., Blackwell Sci. Pub., Oxford 1—13, 1960.
- 2) Caldecott, R.S.: Effects of Ionizing Radiations on Seeds of Barley. Radiation Res. 2, 339—350, 1955.
- 3) Caldecott, R.S.: Effects of Hydration on X-ray Sensitivity in Hordeum. Radiation Res. 3, 316—330, 1955.
- 4) Sicard, M.A. and Schwartz, D.: The Effect of High Doses of Radiation on Seedling Growth. Radiation Res. 10, 1—5, 1959.
- 5) Curtis, H.J., Delihias, N., Caldecott, R.S. and Konzak, C.F.: Modification of Radiation Damage in Dormant Seeds by Storage. Radiation Res. 8, 526—534, 1958.
- 6) Zimmer, K.G.: Evidence for Free-Radical Production in Living Cells Exposed to Ionizing Radiation. Radiation Res. Suppl. 1, 519—529, 1959.
- 7) Conger, A.D. and Randolph, M.L.: Magnetic Centers (Free Radicals) Produced in Cereal Embryos by Ionizing Radiation. Radiation Res. 11, 54—66, 1959.