



Title	低線量照射時における赤血球の静電特性損傷の機転
Author(s)	吉井, 義一; 宮地, 町子
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1963, 23(8), p. 1005-1012
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/15362">https://hdl.handle.net/11094/15362</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# 低線量照射時における赤血球の静電 特性損傷の機転

大阪大学医学部放射線医学教室

吉 井 義 一 宮 地 町 子

(昭和38年8月30日受付)

Electrical Properties of Erythrocytes during Irradiation

By

Giichi Yoshii and Machiko Miyachi

Department of Radiology, Osaka University Medical School

## Introduction

It seems generally accepted that ionizing radiation alters the physical properties of live cells as well as it produces chemical changes. There have been a few observations made on the changes of electrical properties of amphibian erythrocytes<sup>3)</sup> and colloid suspension<sup>1)2)</sup> following irradiation with X-ray. They, however, are referable only to a postirradiation status. However, they should have been carried out even during irradiation, since reactions caused by irradiation are very quick in their development and their resultant responses, either reversible or irreversible. In the present study it was attempted to obtain information on the changes of dielectric constant and conductivity of erythrocyte suspension being exposed to  $^3\text{H}_2\text{O}$ - $\beta$  ray.

## Material and Method

Five ml of blood was drawn by cardiac puncture from a mature Wistar-line hooded rat, randomised as sex, with a syringe wet with heparin. The blood was centrifuged for five minutes at 2500 rpm, and the plasma was removed. Cells were suspended at various concentrations in an isotonic glucose solution which contained  $^3\text{H}_2\text{O}$ (specific activity 1 c/0.2 ml) (Fig. 1). Thus, the erythrocyte suspension was subjected to a constant exposure to  $^3\text{H}$ - $\beta$  ray; the dose given to the erythrocyte suspension was easily calculated from the volume of suspension in terms of the specific activity of  $^3\text{H}_2\text{O}$ . That is, 1ml of the erythrocyte suspension which contained 500mc of  $^3\text{H}_2\text{O}$  is to be irradiated at a dose rate of 100rad/min.

## Experiment 1

The changes of electrical properties which are characterised by dielectric constant and conductivity are most likely to be interpreted as the changes in cell geometry and/or in cellular ultrastructure<sup>5)</sup>. The first approach, on a geometrical basis, was made to the number and size distribution of erythrocytes being irradiated at 40 rad/min in suspension with the method of electrical gating<sup>6)</sup> (Fig. 2). This method measure the resistance of a conducting solution as a particle passes through aperture<sup>7)</sup>. Since relationship exists between the resistance and particle size, a type of size distribution curve is obtained by taking successive counts.

Size distribution curves of erythrocytes during irradiation indicated that  $^3\text{H}_2\text{O}$ - $\beta$  ray

caused negligible changes in their shape and height at a dose below 1000 rad. At 1500 rad and 2000 rad irradiation they shifted to the right, suggesting an increased distribution of large cells (Fig. 3).

### Experiment 2

No evidence seems to have been established that the electrical properties of erythrocyte suspension remain unaffected below 1000 rad. The dielectric constant of erythrocyte suspension during irradiation was determined at a dose below 1000 rad, and compared with that of the erythrocyte suspension which did not contain  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Its measurement was done in a glass cell with two end walls made of 6 mm platinum plates placed 2 mm apart (Fig. 4). Observations of dielectric constant were made with a modified Oncley's technique<sup>8)</sup> developed by the present authors, at a frequency of 8 Mc/sec, by means of an alternating current bridge, with an oscilloscope as a detector (Fig. 5). Dielectric constant,  $\Sigma$  is given by  $\varepsilon = \frac{C_1 - C_2}{C_x} + 1$  (1), where  $C_x$  is the sample cell constant;  $C_2$  and  $C_1$ , a capacity with suspension and without it.

For the above experiment three erythrocyte suspensions with different concentrations were prepared, i.e., 2.5%, 5% and 7.5%.

The dielectric constant of erythrocyte suspension during irradiation at a dose rate of 40 rad/min showed an increase as dosage increased. It, on a reasonable assumption, seemed to demonstrate an increase immediately after irradiation started, although no elevation was detected technically until 25 rad (Fig. 6).

The present calculation of membrane capacity was made on the basis of dielectric constant on an assumption that the cell membrane was poorly conductive and the internal and external fluids purely resistive<sup>9)</sup>. The membrane capacity calculated was about  $0.7 \mu\text{f}/\text{cm}^2$  initially, which agreed with many other experimental results<sup>10)</sup>. The membrane capacity, when the erythrocyte suspension was irradiated at 700 rad, increased to be about  $1.3 \mu\text{f}/\text{cm}^2$  in three suspensions with different concentrations.

### Experiment 3

Measurement of the conductivity of erythrocyte suspension was performed, since it seemed advisable to determine whether an increase of membrane capacity was caused by ion efflux from interior to exterior of the cell or by the changes of dielectric properties of the cell membrane. It was carried out in a routine electrical method with vacuum voltmeter as a detector, with a frequency range of 100 c/sec to 10 Kc/sec, and 8 Mc/sec (Fig. 7).

No changes in conductivity were observed within a range of 100 c/sec to 10 Kc/sec, even if 1000 rad was given to the erythrocyte suspension. But an elevation in conductivity was found in 8 Mc/sec, which meant an increase of membrane capacity (Fig. 8).

With an assumption that cell suspension is theoretically represented by a simple parallel equivalent circuit<sup>11)</sup> (Fig. 9),  $\varepsilon$  and  $\kappa$  may be replaced by  $\varepsilon = \frac{9}{4\Sigma r} \text{PRC}_M$ ,  $\kappa = \kappa_a(1 - \frac{3}{2}p) + \frac{9}{4} \text{PRG}_M$  (2); where  $G_M$  and  $C_M$ , a capacity and a conductance of the cell membrane,  $\kappa_a$ , a conductivity of the external fluid,  $R$ , a cell diameter,  $\Sigma r$ , a numerical factor, and  $P$ , % volume fraction occupied by cells.

Observed change in  $\Sigma$  and  $\kappa$  of a cell suspension for high frequency current must reflect a corresponding change in  $C_M$  and  $G_M$ . On the other hand no change in  $\kappa$  for low frequency indicates that  $\kappa_a$  remains unaffected by irradiation since  $G_M$  term is independent of measurement at low frequency. In other words, an increase of membrane capacity during irradiation

iation at a dose below 1000rad was not caused by ion efflux, but by the change of dielectric properties of the cell membrane.

#### Experiment 4

This experiment in which a considerably large dose had to be given, was carried out at a dose rate of 100 rad/min to erythrocyte suspension. Thus, care was taken lest erythrocyte suspension should be subjected to the least possible influence of time factor, e.g., during Experiment 2 a dose rate proved to be 40 rad/min which did not seem adequate for larger irradiation.

The data obtained from measurement of dielectric constant at 8 Mc/sec indicated that an increase in dielectric constant occurred from the beginning up to 1000 rad, being followed by a gradual decrease.  $\Sigma$  values obtained from a measurement at 2 Mc/sec, proved 2-5 higher than  $\Sigma$  values at 8 Mc/sec, but showed a similar trend of curve (Fig. 10). From the above results it would be safe to suggest that irradiation with more than 1000 rad resulted in damage in the cell structure with an increased distribution of large cells.

The irradiation of erythrocyte suspension containing no  $^3\text{H}_2\text{O}$  with  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray at the same dose rate resulted in only a slight increase of dielectric constant below 1000 rad but a decrease over 1000 rad. In other words, a marked increase of dielectric constant followed by a decrease was demonstrated during irradiation, while only a slight increase was evidenced after irradiation.

#### Discussion and Conclusion

1. There were no significant changes in the number and the size distribution of erythrocyte suspension during exposure to  $^3\text{H}_2\text{O}$  below 1000 rad.

2. An elevation in the dielectric constant of erythrocyte suspension was observed from the beginning up to 1000 rad, in high frequency measurement. The elevation was reasonably considered to originate from the changes of cell membrane capacity.

3. No changes were observed of conductivity in low frequency, suggesting that no liberation of ions from cell interior to exterior occurred during irradiation. Thus, it was supported to conclude that changes of the cell membrane capacity were not caused by liberation of ions, but by polarization of the cell membrane<sup>12)13)</sup>.

4. Irradiation with more than 1000 rad resulted in a decrease of dielectric constant possibly due to initial radiation damage in cell structure. Dielectric constant, when it was measured in a postirradiation status, remained unaffected. This suggests that some of the changes observed during irradiation are apparently reversible.

Biologically, changes in dielectric constant are of great importance because they are detectable at a dose which, in general, is too low to produce measurable chemical changes, but capable enough to produce pronounced biological effects.

This investigation was aided by a Research Grant (RG-9353, 1962-1963) from the National Institute of Health, U.S.A., Bethesda

#### 目的

生細胞が電離性放射線によつて化学的变化を受けるだけでなく、比較的低線量でその物理的性質が変化することについては若干知られているが、変化を生ずる機構は不明である。Crowther とそ

の協同研究者 (1937)<sup>1)</sup> は黒鉛ゾルを用いてゼーター電位が低線量のX線照射で、また Gray とその協同研究者 (1941)<sup>2)</sup> は中性子照射で変化することを見出した。また Lessler (1959)<sup>3)</sup> は蛙赤血球のキャパシティーが比較的低線量のX線照

射により変化することを報告した。しかしこれらの報告はいずれも照射後における電氣的性質の変化の観測にもとづいており、物理的特性の変化の解明には照射時における観測が望ましい。照射後では、イオンや遊離基による分子の反応はすでに細胞の代謝作用によって次の生理的および生化学的損傷へと進められているからである。

従つて筆者らは  $^3\text{H}_2\text{O}$ - $\beta$  線の内部照射によつて生細胞に生ずる電氣的性質の変化（誘電率  $\epsilon$  および導電率  $\kappa$ ）を照射時に、充分に低い線量で捕捉することを試みた。生細胞に致死線量以上を与えることは、生理、生化学的变化のみならず可視的損傷を生ずることが自明だからである。

#### 方法および試料

生細胞としては赤血球を用いた。健康成熟の純系ウイスター系ラツテ（200gr～300gr）を雌雄別なく、生体解剖により直接心臓より穿刺した血

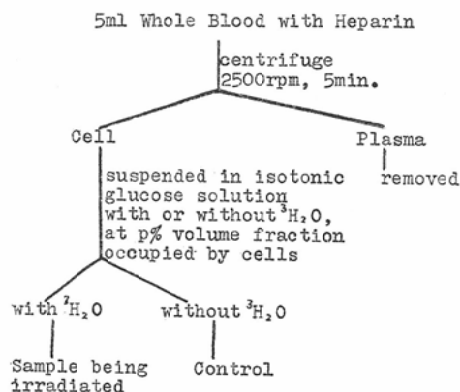


Fig. 1 Sample Preparation

液をヘパリンで凝固阻止処理後使用した。Fig. 1に示す如く、5 ml の血液を2500rpm で5分遠沈後血漿を除き、赤血球を  $^3\text{H}_2\text{O}$  を含む等張ブドウ糖液（5.1%）に浮遊して試料とした。この際、赤血球の濃度 7.5%，5%および 2.5%をそれぞれ作製した。 $^3\text{H}_2\text{O}$  は英国より輸入したもので比放射能は  $1\text{c}/0.2\text{ml}$  である。線量率に応じて 1 ml の試料に対して 200mc および 500mc を投入した。線量率は容易に計算され 1 ml の試料に 200mc で40rad/min, 500mc で 100rad/min が与えられる。また照射時と照射後の効果を比較するために、 $^3\text{H}_2\text{O}$  を含まぬ試料に  $^{60}\text{Co}$  を照射した。

#### 実験 1

比較的低線量での赤血球浮遊液の電氣的特性、即ち誘電率および導電率の変化は主として細胞の変化に起因すると云える。何とならば溶媒（ブドウ糖液）自体の電氣的特性の変化は  $10^4$  rad 以下では測定されないからである<sup>4)</sup>。さらに細胞の誘電率および導電率は細胞の物理化学的性質のほかにもその幾何学的大いさにも依存する<sup>5)</sup>。従つてま

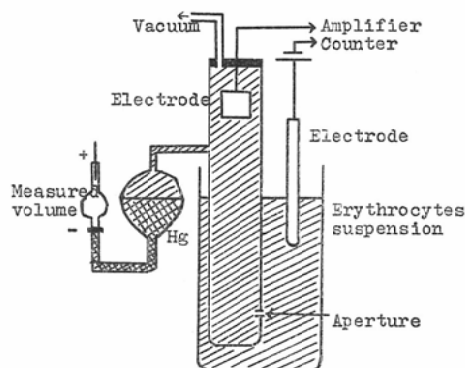


Fig. 2 Schematic diagram of aperture unit

ず、照射時における細胞の数や形の変化を Fig. 2に示した装置によつて観測した<sup>6)</sup>。比較的絶縁体に近い粒子が小孔を流れる時に電極間の抵抗は変化し、その変化の大いさは粒子の大いさに依る<sup>7)</sup>。抵抗の変化を電圧にかえて照射時の浮遊赤血球の Price-Jones 氏曲線を描記した\*。Fig. 3に示す如く、5%の赤血球浮遊液で40rad/minの線量率で与えられた Price-Jones 氏曲線は80 rad から1000rad まで対照（試料作製直後および120分後の  $^3\text{H}_2\text{O}$  を含まぬ赤血球浮遊液について測定したもの）と全く同じである。しかし1500 rad および2000rad では曲線は2つの峰をもち、線量に従い細胞の増大を示して中央値が右へ移動する。なお2000rad 照射でも細胞数の変化は±5%以内である。従つて1000rad 以下では浮遊赤血球の幾何学的大いさに変化はないと云うべきである。

#### 実験 2

前述の如く、1000rad 以下における赤血球浮遊液の照射時の電氣的性質の変化は純粋に細胞の誘

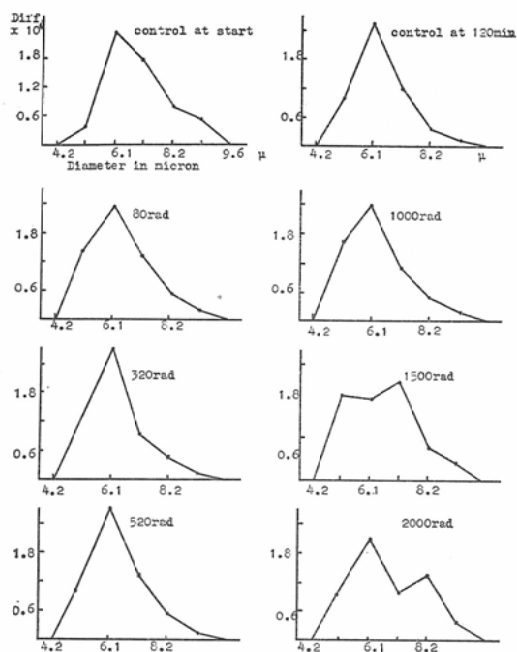


Fig. 3 Cell numbers and size distributions of 5% erythrocytes in glucose solution being irradiated by  $^2\text{H}_2\text{O}-\beta$  ray

電率および導電率に帰せられる。誘電率の測定は Fig. 4 に示す如く、2mm 間隔に置いた直径 6mm の白金電極をもつセルに試料を入れた時（以下試料セルと云う）の照射時における試料セルのキャパシティーの変化より求められる。測定装置は Fig. 5 に示す如く Oncley (1938)<sup>8)</sup> の方法を改良し

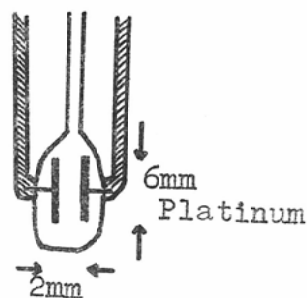


Fig. 4 Type of Sample cell

た方法で、試料セルとバリコンを含む発振出力をブラウン管の縦軸に、水晶発振器による標準高周波を横軸に導入してリサージュの図形を描かせ、照射によつて生ずる試料セルのキャパシティーの変化をバリコンによつて調整してリサージュの図型を保持する。バリコンの変化を  $\Delta C$ 、試料を入れない場合のキャパシティーを  $C_x$  とすれば、誘電率  $\epsilon$  は次の式により求められる。

$$\epsilon = \frac{\Delta C}{C_x} + 1 \dots \dots \dots (1)$$

標準周波数として 8 Mc/sec を用いて 40rad/min で試料作製直後より 20 分間、即ち 800rad までの  $\epsilon$  を求めた。尚、ブドウ糖液の  $\epsilon$  は 80.5 であり、試料セルは  $15 \pm 2^\circ\text{C}$  に保持した。得られた結果を Fig. 6 に示す。25rad 以下の線量では有意義な  $\epsilon$  の増加を弁別することは困難ではあるが、対照と比較して、試料作製直後、即ち線量を与え始めてから直ちに  $\epsilon$  の増加を示すことは明らかである。

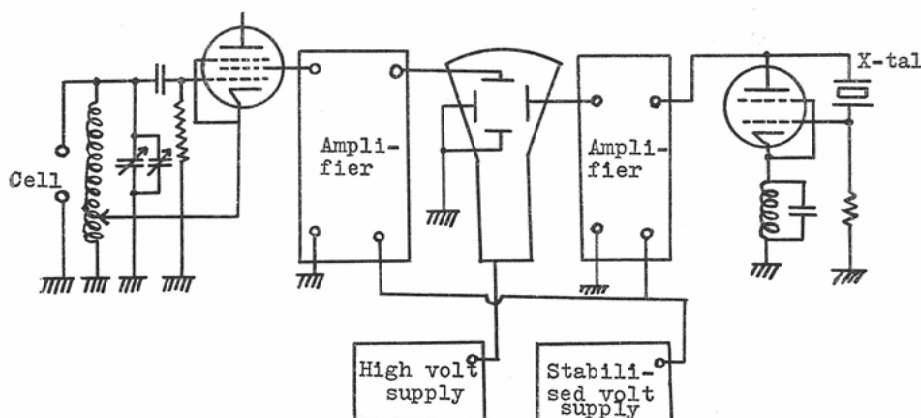


Fig. 5 Measurement apparatus of dielectric constant and conductivity

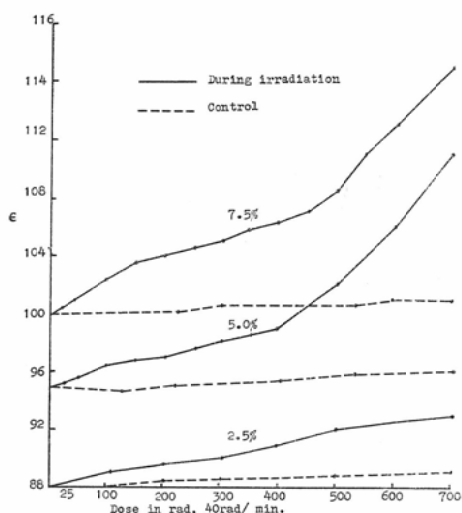


Fig. 6 Dielectric constant of three concentrations (7.5%, 5%, and 2.5%) of erythrocytes in glucose solution being irradiated at a frequency of 8 Mc/sec

浮遊赤血球の細胞壁が高抵抗であり、細胞内外液が交流抵抗を持たないと考えるならば、赤血球の浮遊濃度と大きさにより細胞膜のキャパシタンス ( $C_M$ ) は容易に計算することが出来る<sup>9)</sup>。等価回路および計算式は実験3に示す。非照射時では細胞壁の容量は  $0.7\mu f/cm^2$  であり他の実験結果と一致している<sup>10)</sup>。また3つの濃度に対して 700rad 照射では約  $1.3\mu f/cm^2$  に増加した。極めて大きな容量の変化と云わねばならない。

### 実験 3

低線量照射時における細胞膜の  $C_M$  の増加は、照射によつて細胞膜が細胞内の陽イオンあるいは陰イオンに対して選択的に透過性を示し膜が分極することによつて増加したのか、あるいは照射により細胞外液に生じたHあるいはOHイオンあるいは遊離基の細胞膜への吸着に起因して分極したのかの問題が提起される。前者であれば、細胞外へのイオンの流出により赤血球浮遊液の導電率が変化せねばならない。導電率の測定は良く知られた Fig. 7 に示した方法で 100c/sec から 10 Kc/sec までの低周波で行った。結果を Fig. 8 に示す。5%の赤血球浮遊液では 700rad まで導電率に変化が認められない。一方 8 Mc/sec では誘

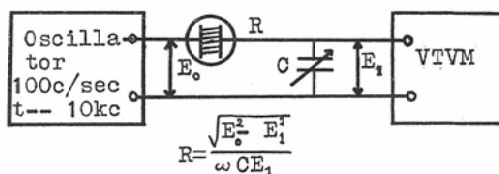


Fig. 7 Measurement method of conductivity

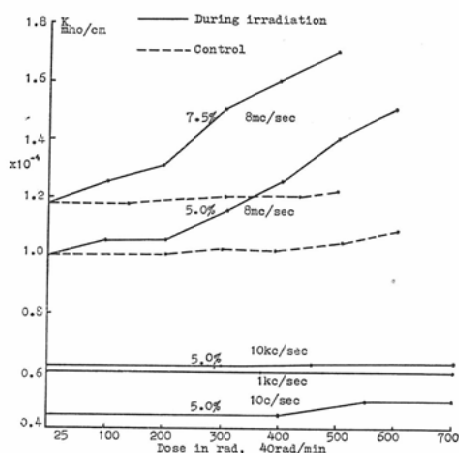


Fig. 8 Conductivity of 7.5% and 5% erythrocytes in glucose solution being irradiated at a frequency of 8Mc/sec, and at frequency of 10c/sec to 10kc/sec.

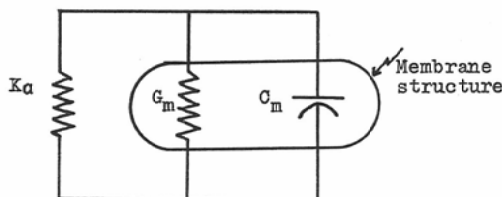


Fig. 9 Equivalent circuit for erythrocyte suspensions. Internal and external cell medium are assumed purely resistive.

電率の上昇と同じ割合で変化する。これらの結果を解釈すべく Fig. 9 に示す如き等価回路を浮遊赤血球に対して認めるならば、誘電率  $\epsilon$  および導電率  $\kappa$  は

$$\epsilon = \frac{9}{4\epsilon_r} PRC_M \quad \kappa = \kappa_a \left(1 - \frac{3}{2}P\right) + \frac{9}{4}PRG_M \quad (2)$$

で与えられる<sup>11)</sup>。Rは細胞の直径、Pは細胞浮遊液の濃度、 $\Sigma_a$ は比例常数、 $\kappa_a$ は細胞外液の導電率、 $C_M$  および  $G_M$  は細胞膜のキャパシタンスおよ

びコンダクタンスである。低周波交流に対してはGMは変化しないから $\kappa$ が照射に対して増加しないことは $\kappa_a$ に変化がないことを示している。また高周波に対してGMはCMの増加とともに増加するので $\kappa$ は増大する。(これはCMの増加の裏付けであり、 $\kappa_a$ の増加には関係しない)換言すれば、低線量では細胞内より細胞外へのイオンの流出はない。この事実より細胞膜のCMの増加は細胞外液に生じたイオンあるいは遊離基に起因すると考えられる。

#### 実験 4

次に1000rad以上における赤血球浮遊液の誘電率 $\epsilon$ の測定を試料作製後30分以内に完了するために、1mlの試料に500mc,すなわち100rad/minの線量率を与えた。標準周波数としては8Mc/secのほかに2Mc/secを用いた。また照射後の $\epsilon$ の測定には $^3\text{H}_2\text{O}$ を含まない試料に $^{60}\text{Co}$  1000cを外部照射源として用い、線量率は100rad/minとした。得られた結果をFig. 10に示す。8Mc/secで測定した $\epsilon$ の増加は700radまでは実験3の結果と全く同様で、1000radまで上昇し以後漸減し3000radでは初めの $\epsilon$ の値を示した。2Mc/secで測定した結果は8Mc/secの測定に比して $\epsilon$ の

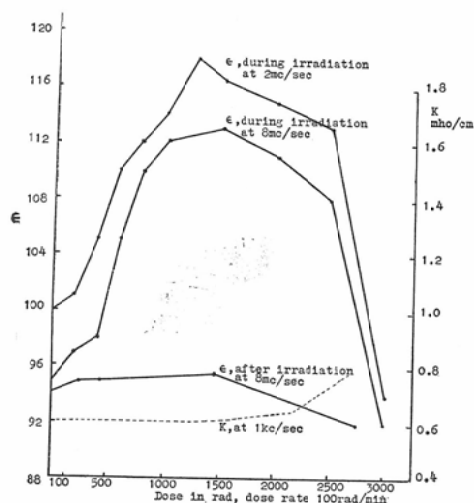


Fig. 10 Dielectric constant of 5% erythrocytes in glucose solution being irradiated or after irradiation at a frequency of 2Mc/sec or 8Mc/sec.

増加は2~5だけ高く、線量に対する変化は8Mc/secと同じ傾向を有する。 $^{60}\text{Co}$ 照射後10分における $\epsilon$ の値を8Mc/secで測定すると、1400radまで僅かに上昇するが2800rad照射では減少し、同線量の照射時に得られた値に一致する。1000rad附近を弯曲点として $\epsilon$ が減少する点に注目すべきである。2000radにおいては実験1で細胞の増大が認められているので、(2)式よりRの増加(2000radで10%)から $\epsilon$ の増加が期待されるにも拘らず $\epsilon$ が減少して来る事実からCMが減少していると考えざるをえない。一つの解釈は2000radにおける $\kappa$ の上昇(Fig. 10)からみて細胞の膨脹とともに細胞内のイオンが多少とも流出し、細胞表面に吸着しているHあるいはOHイオンと反応することにより膜の分極性が失われCMが減少すると推論する。2Mc/secによる測定値が8Mc/secの値に比し1000rad照射までかなり大きな値を示すのは、異つた $\epsilon$ と $\kappa$ からなる細胞膜の構造<sup>12)</sup>\*\*に起因する構造的な分散ではなくて、膜の極性による分散<sup>13)</sup>\*\*\*と考えれば前述の推論を更に支持する。照射後の測定で1000rad附近まで $\epsilon$ が上昇しないのは実験3において推論した細胞外に生じたHあるいはOHが照射後再結合して $\epsilon$ の増加をきたさないものと考えられる。

#### 考察および結論

(1) 1000rad附近までは照射時における浮遊赤血球の構造的変化は認められない。

(2) 細胞の誘電率は照射時には低線量によっても変化し、25rad照射では明らかに有意義な増加が認められる。

(3) この $\epsilon$ の増加の原因は照射による細胞内イオンの流出に伴う細胞膜の分極に起因しているとは考えられない。

(4)  $\epsilon$ を膜CMに対応させれば、CMの増加は細胞外液に照射によつて生じたHあるいはOHイオンまたは遊離基の細胞膜への吸着による膜分子の分極によつて生じたものと考えられる。

(5) 2000rad以上の照射でみられる $\epsilon$ の減少



は細胞の大きいさの増加に伴って細胞内イオンが流出し、細胞膜の分極性が失われると推論される。

(6) 低線量照射後において $\epsilon$ が増加しないのは膜面に吸着したHあるいはOHイオンの再結合によると考えられる。

生細胞は電離性放射線によって生じたHあるいはOHイオンによって初期の変化、即ちこれらの膜面への吸着により膜に分極を起す。閾値はないであろう。これらの現象は照射後は再結合により見かけ上脱分極が起るが、次に続く反応の出発点として痕跡(たとえば分子配列の不可逆性)を残すであろう。形態的に不可逆性変化は1000rad以上でみられ、可視的な初期の膜損傷として現われる。筆者らの $^{22}\text{Na}$ および $^{36}\text{Cl}$ を用いた前報告

\* この場合、ブドウ糖液は抵抗が大きいので $^3\text{H}_2\text{O}$ で照射されている浮遊赤血球を等線量率の $^3\text{H}_2\text{O}$ を含む生理的食塩水に入れて、赤血球が閾門を通過する際の抵抗を測定した。

\*\* 膜は蛋白層でおおわれている30~40 Åの脂質層からなりたっているので蛋白と脂質の二重層に起因する構造的分散。

\*\*\* 異った $\epsilon$ および $\kappa$ をもつ二重層に生ずる誘電分散は高周波では起らず、低周波において生ずる(WagnerとMaxwellの分散)。双極子の高周波交流電場による回転とブラウン運動の競合による分散(Debye)は高周波に起る。従つてこの場合はDebyeの分散である。

本研究に有益な批判を賜つた立入弘教授ならびに実験に際して労を惜しまず助力を戴いた猪熊正克氏に深甚の謝意を表する。

によれば、細胞内外電解質の流出入の損傷は $10^3$  rad以上から確認され、初期の溶血は $10^4$  rad以上より認められている。

生細胞の放射線損傷は極めて低線量による初期の物理的变化が、如何なる機構によつて化学的变化に移行するかが問題であろう。また赤血球の如き非分裂細胞のみならず、細胞内に含まれる多くの膜によつて保持される細胞下構成物質(核やミトコンドリア等)が放射線による初期効果として如何に変化するかを追求することが望まれる。

## 文 献

- 1) Crowther, J.A., Liebmman, H. and Lane, T.B., *Pril. Mag.* 24, 654 (1937). — 2) Gray, H.L., Read, J. and Liebmann, H., *Brit. J. Radiol.* 14, 102 (1941). — 3) Lessler, M.A., *SCIENCE*, 129, 1551 (1959). — 4) Yoshii, G., unpublished.
- 5) 例えば Schwan, H.P., *Advance in Biological and Medical Physics*, Vol. V, p. 148 (1957). — 6) Mattem, C.F.T., Fredric, S.B. and Open, J.O., *J. Appl. Physiol.* (10) 1, 56 (1957). — 7) Kubitschek, H.E., *Nature*, 182, 234 (1958). — 8) Oncley, J.L., *J. Am. Chem. Soc.* 60, 115 (1938). — 9) Schwan, H.P., *proceeding of the I R.E.* p. 1841 (1959). — 10) Cole, K.S. and Curtis, H.J., *Medical Physics*, p. 344, *The Year Book Publishers, Inc., Chicago* (1947). — 11) Schwan, H. P., *Medical physics*, p. 344, *The Year Book Publishers, Inc., Chicago* (1947). — 12) Ponder, E., *Scientific American*, 196, 95 (1957). — 13) Smith, P., *Dielectric Behaviour and Structure*, McGraw Hill Book Co. Inc., New York, (1955). — 14) 宮地, 吉井, 本誌, 22, 204 (1962).