



Title	D.N.A. 稀薄溶液に對する放射線作用の研究補遺
Author(s)	渡邊, 一
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1958, 17(11), p. 1275-1280
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16308
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

D.N.A. 稀薄溶液に對する放射線作用の研究補遺

北海道大学医学部放射線医学教室 (主任 若林勝教授)

渡 邊 一

(昭和32年7月24日受付)

緒 言

稀薄溶液に於ける放射線の作用機序は、水から生ずる游離基が主役をすなものである。この游離基と溶質との間の化學反應或は游離基の結合によつて出来る化合物と溶質との化學反應によつて放射線の作用が出現すると考えられている。¹⁾²⁾³⁾ 然し乍ら最近高山⁴⁾ はパラアミノ安息香酸の水溶液について放射線の作用を詳細に検討した結果、化學反應説では説明することが出来ないと言ふ。

若林⁵⁾⁶⁾⁷⁾ はこの變化を物理的なものと考えている。即ち浮離基が溶質分子に運ばれそこで安定化する時に游離するエネルギーが溶質分子を勵起し分子の反應性の變化を來し、これ等の一部が非常可逆的變化となるのであろう。

游離基と溶質との間に起る最初の變化は、物理的なものであると説いている。

著者はこの若林の考えをD.N.A.溶液について検討せんとして本實驗を企てた。DNA水溶液を照射するとき、その粘度に著しい變化を來すことは既に知られている⁸⁾⁹⁾。然して Scholes¹⁰⁾ Limperos¹¹⁾, Butler¹²⁾ 等は何れもこの照射によるD.N.A.水溶液の粘度低下は游離基の化合によつて生ずる H₂O₂ によるものであると云ふ。

著者は先づ之等先人の業績を追試し次いで粘度低下が放射線の間接作用によつて惹起されることを確め、更に H₂O₂ による變化と照射による變化とを比較検討した。之等の結果より若林の説を批判せんとするものである。

實驗方法

(1) 試料とした Desoxyribose nuclie acid (D.N.A.と略稱する) はミノファゲン製菓製造の鰹の白子より造つたものである (製造番號 No.

31)。之を蒸留水で膨潤溶解した後濾過して使用に供した。

(2) 粘度測定

粘度測定は Jones-Veazey 氏粘度計を用い20.0 ± 0.1°Cの恒温槽中で行つた。用いた粘度計の20°Cの蒸留水3ccの落下時間(T)は夫々 No.1, 175.0'/No.2, 171.6'/No.3, 176.0'/No.4, 158.8'/No.5, 'No. 149.06, 154.6' であつた。Jones-Veazey 代粘度計にては、試料の落下時間は60'より小でなければよいとされている¹³⁾ ので、これ等の粘度計は充分使用し得るものであつた。

水の落下時間をT, 試料の落下時間 T' を測定し $\eta' = \eta \frac{\delta' T'}{\delta T}$ の式¹⁴⁾より水の粘度 $\eta = 1$ とおき試料の相對粘度 η' を求める (δ, δ' は水及び試料の密度、この場合 $\delta = \delta'$ と見なす)。i/j-1 = Specific viscosity (S. V.) このS. V. が比粘度である¹⁴⁾。

(3) X線照射條件

當北大放射線科教室のスタビリボルト號深部治療用裝置を用い、管電壓 160Kvp, フィルター 1.0mmAl, 管電流 5mA, 焦點試料中心間距離 7cm (液層 2cm), 線強度2000r/min で 1×10^4 r乃至 10×10^4 の各線量を照射した。照射は室温で行い、對照とした非照射試料は照射試料と全く同一條件に保つた。

實驗成績

實驗1 濃度と粘度の關係

先づ高分子化合物であるD.N.A.の濃度と粘度との關係を検索した。0.5%D.N.A.水溶液を蒸留水にて階段稀釋 (0.2%~0.0125%) し、夫々の比粘度を測定した。その結果は圖1に示す如く

図 1

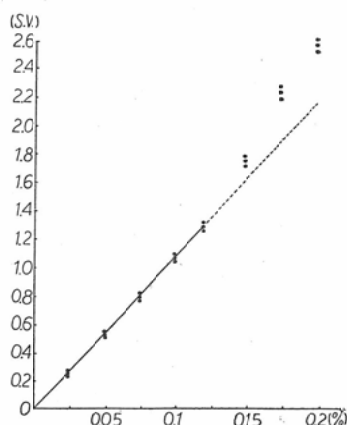


表 1 自然放置の影響

	開 始	経 過 時 間			
		3	6	9	24
平均	0.567	0.560	0.554	0.553	0.545
変動範囲	0.550~0.585	0.550~0.572	0.545~0.560	0.542~0.560	0.527~0.558
百分比	100	99.0	97.7	97.5	96.1

D.N.A.濃度が 0.125%以下で原点を通る直線となる。これより濃度が大となると濃度の増加に比例する粘度の増加は見られなくなる。従つて以下の実験に於いては 0.125%以下の濃度を使用した。

実験2. D.N.A.水溶液自然放置下の経時的変化

D.N.A.水溶液を作成後放置した場合自然に粘度が低下するか否かを検索した。0.05%の試料5コについて20°Cに放置して24時間迄経時的に粘度を追究した。表1に示す如く、水溶液製作後僅かではあるが徐々にS.V.は低下し24時間後には3.9±2.4%の粘度低下を認めた。この24時間後の変化は推計學的に検討するに有意差はない。Butler et al¹²は長時間放置しても粘度の変化のないことを認めて居り2週間にわたり変化がなかったと云つて居る。

実験3 X線の影響

0.05%D.N.A.水溶液に1×, 2×, 3×, 5×, 10×, 10⁴rを照射して24時間迄経時的変化

を追究した。照射前比粘度を100とすると図2の如くなる。一般に照射中止後30分に粘度低下を来し、1時間後には更にその度を増しその後3時間、6時間と軽度に低下の度を増し、24時間では6時間と同程度の粘度低下を示して居る。尚粘度低下の度は照射線量が大となるにつれ著しくなつた。

この照射による粘度低下は照射後に起り然も照射後時間と共に更に粘度低下が進行し、6時間以後はその進行は停止し24時間でも原値に戻る傾向はなかつた。この現象は所謂 after effectと云ふべきものである。然してこの変化は少くとも24時間迄は非可逆的変化である。高分子のD.N.A.が照射によつて低重合化を来したものと考へねばならない。

尙この際線量と粘度変化との関係を知るために、照射後1時間目及び24時間目の変化の度について、粘度の変化の對數を縦軸に線量を横軸にとつて圖示すると圖3の如くであつた。即ち5×10⁴r以下の線量範囲では粘度低下と線量との間に指數函數的關係が成立するがこれを越える大線量照射の場合はこの關係は成立しない。

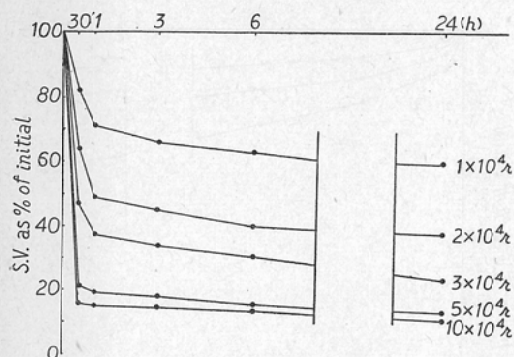
以上からD.N.A.水溶液のX線照射による粘度低下には after effect が見られると云ふこと及び粘度低下の度は照射線量が大となるにつれ著しくなると云ふことが出来る。この結果は先人の業績と同様である。

実験4 稀釋効果について

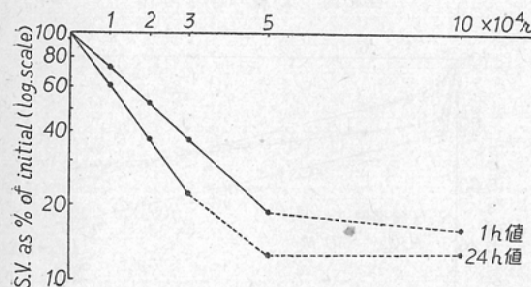
Limperos¹¹等は乾燥し又は凍結したDNAにX線を照射しても粘度は變化を來さないことを認め、DNA水溶液に對するX線の作用は間接作用が主役を演ずるのであらうとのべて居る。著者はこの點を追試する爲に階段稀釋(0.1~0.0125%したD.N.A.水溶液に1×, 2×, 3×, 10⁴rの各線量を照射し、経時的に24時間迄粘度變化を追究した。照射前比粘度を100とすると圖4の如くである。これによるとX線による粘度の低下は同一線量では濃度が小となるにつれて粘度低下は大となる。

各濃度の試料について37%線量(粘度をe/1に

第2図 X-線の影響



第3図



低下させるに要する線量，但しeは自然對數の底)を比較すると表2の如く，D.N.A.濃度が小となるにつれて小となる。

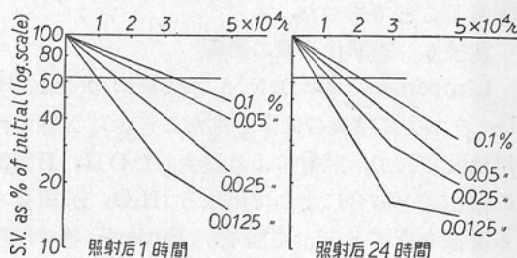
即ちD.N.A.水溶液のX線照射による粘度低下にも稀釈効果が認められ，間接作用が關與することを示して居る。

實驗5 酸素の影響について

放射線化學で云う間接作用説によれば，放射線の作用効果は溶媒中の酸素濃度によつて影響されると云う(16)(17)(18)。著者は放射線の after effect を起す機構に對しても同様なことが在るか否かを確めるため酸素の有無による影響の檢索を試みた。

0.05% D.N.A.水溶液を2ccのアンブレに入れ，真空ポンプに連結5分間振盪しつゝ溶液中の酸素を除去し氣密に封じたものを試料とした。この對照としては酸素を除去しないものを使用した，この酸素除去，非除去の2群の試料に同時に同線量(1~5×10⁴r)の照射を行いその各々の粘度を経時的に追求した。その結果は圖5に示す如

第4図 稀釈効果



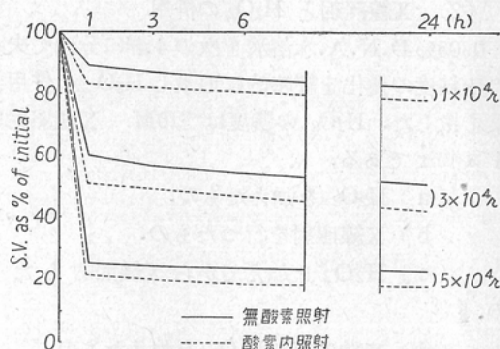
第2表 37%線量

濃度 %	37%線量 (×10 ⁴ r)	
	照射後1時間値	照射後24時間値
0.1	3.5	2.1
0.05	2.6	1.6
0.025	1.7	1.2
0.0125	1.0	0.8

くである。

即ちX線照射によるD.N.A.の粘度低下は無酸素状態でも起る。但し無酸素状態にて照射せる場合は酸素存在下のX線照射による粘度低下より明かに軽度であつた。酸素が何らかの役割をなして居ることを物語るものである。然して之は次の様に考えられる。大なるエネルギーを游離する游離基の生成が酸素存在下では多く出來ると云うことによるのであろう。

第5図 酸素効果



高山⁴⁾のバラアミノ安息香酸についての實驗(酸素効果)に於いてもこの場合と全く同様な結果が得られて居る。高山の場合は照射中に起る現象についてであり，本實驗の場合の如く所謂 aft

ereffect についても酸素効果が見られたことは興味あることであった。

実験6 過酸化水素の影響

Limperos¹¹⁾等はD.N.A.水溶液に0.1Mの H_2O_2 を加えて粘度の低下を見たことからX線の作用は間接的で、照射により発生したOH, H基等の自由基の結合によつて出来る H_2O_2 が重要な役割をなすと云つて居る。Butler¹²⁾等は照射後も引續いて變化を起す作用について、自由基がかなり長く残る活性物質、例えば H_2O_2 或いは有機過酸化物の生成の可能性を考えて居る。又彼等はD.N.A.水溶液に0.002Mの H_2O_2 を加えて紫外線照射する時は照射による粘度低下が著しく促進されると云う¹²⁾。

そこでX線照射によるD.N.A.水溶液の粘度變化に H_2O_2 がどのような影響を與えるかを検索した。

(1) H_2O_2 の影響

0.05%のD.N.A.水溶液に $10^{-1}M$, $10^{-2}M$, $10^{-3}M$ の H_2O_2 を加えて粘度を経時的に追求した。その結果は圖6に示す如くであつた。

H_2O_2 はD.N.A.水溶液の粘度を低下させる。その度は H_2O_2 の量の増加と共に大となる。 H_2O_2 を加えると24時間迄殆んど直線的な粘度の低下が見られる。この時間的消長はX線照射の場合と趣を異にして居る。

(2) X線照射と H_2O_2 の併用

0.05% D.N.A.水溶液を次の4群に分けて夫々の比粘度の變化を経時的に追求し H_2O_2 の併用効果を檢した。 H_2O_2 の濃度は $10^{-2}M$ 、X線照射は $1 \times 10^4 r$ である。

(a) H_2O_2 を加えたもの。

(b) X線照射を行ったもの。

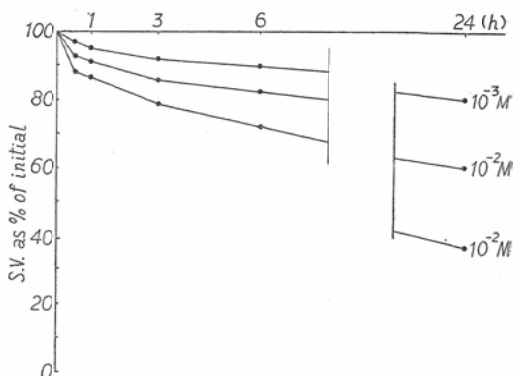
(c) H_2O_2 を加えてからX線照射したもの。

(d) X線照射後 H_2O_2 を加えたもの。

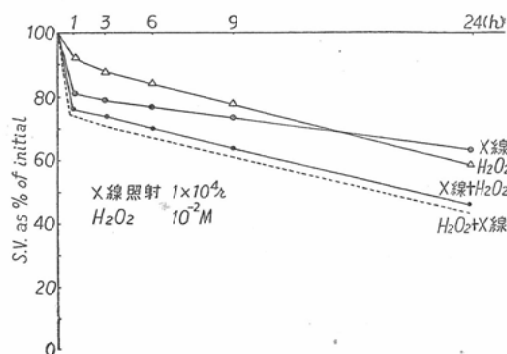
以上4群の実験結果は圖7に示す如くである。

即ち H_2O_2 $10^{-2}M$ では24時間迄直線的低下を續ける。X線では照射中止後1~3時間までに急激に低下その後24時間迄は軽度の低下を來すにすぎ

第6圖 H_2O_2 の影響



第7圖 X線・ H_2O_2 併用



ない。併用の場合は何れも1~3時間で急激に低下し更に24時間後にも可成の低下を來して居る。然もその度は明らかにX線單獨の場合より大である。この低下の時間的経過より見て併用によつて夫々の作用が相加或いは相乗するのではなく、X線の作用と H_2O_2 の作用とが獨立的に存在すると考えられる。何故ならば處置後3時間時に比し24時間時に更に著しい低下を來すのは H_2O_2 の固有の作用でX線の場合とは明かに異なる。又 H_2O_2 單獨の場合、及びX線と併用の場合の3群の3時間以後の経過は全く平行的である。

之等のことよりX線照射による粘度低下は自由基から生ずる H_2O_2 によることを全くは否定出来ないにしても、少なくとも照射によつて發生する H_2O_2 のみによつては證明出來ないと考える。

總括考察

D.N.A.の濃度 0.1%以下の稀薄溶液をX線照射するに著しい粘度低下を來す。然も照射中止後更に粘度低下の進行を見る。即ち照射の after effect が明かに認められる。著者は本實驗に於いて照射中止直後の値は測定しなかつた。照射が室温で行われる關係上室温の試料を恒温槽中で温度平衡を保つに時間を要する等のことで測定出来なかつた。

兎に角照射中止後30分値より1時間値の方が更に粘度の低下が著しく又その低下の傾向は24時間迄繼續することから見ても明かに照射による D.N.A.水溶液の粘度低下と云う現象は after effect が關係することは確である。

然してこの粘度低下を來す機構に關しては放射線化學で云う間接作用によることは稀釋効果のあること(實驗4)及び酸素効果のあること(實驗5)から明かである。Limperos¹¹⁾等は freezing effectや濃度の高いD.N.A.溶液では變化の見られないことから間接作用によると云つて居る。之等は著者の見解と一致するものである。

さてこの照射による粘度變化を起す機序に關して Limperos¹¹⁾ Batler¹²⁾ Butler¹³⁾ 等は水から生ずる自由基の生成物である H_2O_2 を重要視している。その根據としてはDNA水溶液に H_2O_2 を加えるときは粘度低下を來すこと。又低下の度が時間の経過と共に増しX線照射の場合と現象的に一致すること等をあげている。然し乍ら著者の實驗結果(實驗6)を詳細に検討する時はこの現象のすべてを照射によつて生ずる自由基からの H_2O_2 のみによつて説明し盡されると云う譯にはいかない。

H_2O_2 を加えて更にX線照射を行うとか或いは逆にX線照射後に H_2O_2 を加えた場合にも定性的には全く同一の變化を來すこと。又之等處置後3時間以後の経過は兩者共加えられた H_2O_2 の影響であることが對照實驗との比較から明かにうかべること等からこの併用の効果は内容的には夫々獨立の作用が組合つただけのことであると解せる。

又水をX線照射して生ずる H_2O_2 の量は極めて

少量で數百万rで僅かに 6 γ /cc 程度である (pH 7 附近¹⁶⁾)。

従つて本實驗の場合の如く 10^4 程度の照射 (pH 6.2) では生ずる H_2O_2 の量は 10^{-2} M より遙かに少ないのであるからこの H_2O_2 のみによつて粘度低下を惹起するとは考えられない。又 Bonet-Maury¹⁶⁾は 0.1 γ /cc の感度ある H_2O_2 の定量法によつて酸素を完全に含まない水からは數百万 r 照射しても H_2O_2 の發生を見ないと云う。著者の實驗に於いて不完全ではあるが酸素を殆んど除去して照射した場合(實驗5)にも明かに照射の効果があつた。この事は照射によつて溶媒から間接的に生じた H_2O_2 によつてD.N.A.溶液の粘度低下を來すと説明し得ない有力な根據と云えよう。

水溶液を照射して起す變化の機序に關して次の様な考え方をして居る者がある⁵⁾⁶⁾²⁰⁾。即ち照射によつて生ずる自由基をエネルギー擔體と考え、之が溶質分子に運ばれて之にエネルギーを與える。エネルギーを與えられた分子は分子全体として勵起状態となりその分子の反應性が變化する。この變化は主として物理的状態變化で多くは元の状態に戻り一部が更に化學變化(非可逆的)となると云う。

之によれば游離基によりエネルギーを與えられたD.N.A.分子は勵起状態となりその結果分子は反應性の變化を來し之がD.N.A.分子の低重合化となるものと解せよう。

然して無酸素の水を照射しても H_2O_2 は生じないが游離基は發生する。従つてこの游離基によつてD.N.A.分子は低重合化される。

かく考えれば、酸素の有無にかゝらず粘度低下を來すことを容易に説明することが出来る。

然してこの勵起状態から直ちに低分子化が起るのではなく、それまでの間に連鎖的に化學反應が繰返されて遂に低重合化が起るのであろう。又化學的には勵起されたDNA分子中に Butler¹²⁾等の云う有機過酸化物が生成されることも考えられる。この有機過酸化物によつて低重合化するのに時間を要するとすれば after effect も説明されよう。

著者は照射によるD.N.A.水溶液の低重合化は間接作用によることを明かにしその機序については少なくとも無機H₂O₂によつて起るものでないことを主張するものである。そして遊離基をエネルギー擔体と見做し之によつてD.N.A.分子がエネルギーを與えられ勵起状態となることがD.N.A.分子の低重合化の第一階程であると主張し若林の假説を支持するものである。

結 論

D.N.A.水溶液の粘度に對するX線の作用を検討し次の結果を得た。

1) X線照射によりD.N.A.水溶液の粘度は低下する。更に after effect による粘度低下が見られる。粘度低下の度は線量が大となる程著しくなる(1~10×10⁴r)。

2) D.N.A.水溶液の各濃度(0.1~0.0125%)に於ける37%線量は濃度の小なる程小となる。即ち稀釋効果が認められる。

3) 無酸素照射にてもD.N.A.の粘度は低下するが酸素中照射より低下の度は小である。

4) 過酸化水素を作用させてもD.N.A.の粘度は低下する。X線照射と過酸化水素を併用する時は夫々單獨の作用が存在すると考えられる。

5) X線による粘度低下は照射により生ずる過酸化水素、特に無機の過酸化水素によるとは考えられない。その機序について若林の説によつて説明した。

(擧筆するに當り、種々御教示を戴きました徳島大学河村教授、並びに御助力戴いた教員各位に深く感謝致

します。)

本論文要旨は、昭和31年4月第15回日本医学放射線学会總會(東京)、昭和31年10月日本医学放射線学会第13回東北、北海道、新潟地方會(盛岡市)、昭和31年10月北海道医学会(札幌市)に於いて発表した。

参考文献

- 1) C.B. Allsopp: Brit. J. Rad. 24, 413, (1951).
- 2) F.G. Spear: Brif. JR. ad. Suppl. 1, (1947).
- 3) Painton F.S.: Nature 160, 268, (1947).
- 4) 高山: 日医放誌第16巻第9号, 963 (昭31).
- 5) 若林: 日本医事新報, 1579号 (昭29).
- 6) M. Wakabayashi and F. Kawamura: Monogr. Res. Inst. Appl. Elec. 5, 91 (1955).
- 7) M. Wakabayashi, F. Kawamura and J. Okidate: JopJ oav. Physiol. 5 Suppl. Feb. 382 (1956).
- 8) Tayler, B.J.P. Greenstein & A. Hollaender: Science. 105, 263 (1947).
- 9) Sparrow, A.H. & F.M. Rosenfeld: Science. 104, 245 (1946).
- 10) Rcholes, G, Go. Stein & J. Weiss: Nature. 164, 709 (1949).
- 11) Limperos, G & M.A. Msher: Am. J. Roent. Rad. Th. 63, 681 (1950).
- 12) Butler, J.A.V. & K.A. Smith: Nature 164, 847 (1950).
- 13) 吳, 小寺: 化学実験学第2部, 第3巻, 108 (昭15).
- 14) 吳, 小寺: 化学実験学, 第2部, 第3巻, 107 (昭15).
- 15) 吳, 小寺: 化学実験学, 第2部, 第3巻, 118 (昭15).
- 16) P. Bonét-Maurg: Brit. J. Radiol. 24, 284 (1951).
- 17) M. Errera, A. Herve: Mécanismes De L'action Biologique Des Radiation Paris
- 18) 湊: 日医放誌第16巻第4号, 392 (昭31).
- 19) Butler, G.C.: Canadian. J. Res. 27, B, 972 (19, 49).
- 20) Nickson ed: "Symposium on Radiobiology" J. Wiley and Sons, New York. (1952).