OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	「腹水腫瘍のデスオキシリボ核酸含量に及ぼすX線の影響」
Author(s)	川本, 溢雄
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1956, 16(7), p. 799-805
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19465
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

「腹水腫瘍のデスオキシリボ核酸含量に及ぼすX線の影響」

大阪大學醫學部放射線醫學教室(主任　西岡時雄教授)
川　本　溢　雄

(昭和31年6月20日受付)

緒　言

放射線の生物學的作用のうちで重要なものの一つは細胞の遺傳學的現象に起る變化である．デスオキシリボ核酸（DNA）は細胞の染色體の重要なる構成成分であり，細胞の遺傳，分裂，又核小體，細胞質に於ける蛋白質，リボ核酸（RNA）の合成等に重要なる意義を有するものと考えられている[1]．

X線は染色體斷裂等を惹起するものであるから[2]，DNAに對するX線の作用を理解することの必要なるは論を俟たない．

而して既にこの方面の研究は物理學的に，生化學的に，組織化學的に，或は放射性同位元素を用いて廣汎にわたつている[3)4)5)6)7)8)9)10)11)12)13)]．放射線の惡性腫瘍に對する作用の研究に腹水腫瘍が好個の實驗材料であることは枚擧にいとまなき程の報告[14)15)16)17)18)19)20)21)22)23)24)]があることによつても知られるところであり，就中腫瘍細胞の均等浮游液と見做し得る點から，その化學的構成成分に關する研究に多くの利點をもつことは，G.klein[25)]のつとに指摘し來つたところである．

著者は放射線治療學の立場から惡性腫瘍に對するX線作用の機構究明に資する目的で腫瘍細胞のDNA含量に對するX線の影響を觀察せんとし，放射線感受性の高い吉田肉腫，及び比較的感受性の低い Ehrlich 腹水癌を用い，腹水腫瘍細胞のX線全身照射によるDNAの含量の變動を化學的定量法によつて觀察すると共に，Ehrlich 腹水癌に於いてはX線照射線量とDNA濃度の變動との關連性を主として追求した．

實驗方法及び實驗成績

I　吉田肉腫

A　實驗方法及び材料

實驗動物として吉田肉腫の移植に約 100 g の市販雜系ラツテを雌雄の別なく用い，實驗は使用の約2週間前から同一條件で飼育した．このラツテの腹腔内に腫瘍細胞 6～15×10^6 個を含有する腹水を移植し，X線照射によつて腹水量が著しく減少する事が多いので，DNA含量の測定は腹水の充分貯溜した移植後6～8日の腹水について行つた．

X線照射條件：二次電壓 160 kVp，管電流3 mA，Cu 0.5㎜＋Al 0.5㎜，動物焦點間距離 23 Cm，20r/min，500r 一回全身照射．

試料調整：移植ラツテ腹腔内より採取せる一定量の腹水に直ちに氷冷2％枸櫞酸加生理的食鹽水を加えて10～15倍に稀釋し，溫和且つ十分に振盪し，細胞均等浮游液とし，これについてDNA含量を測定した．一方その一少部分を20～50倍に稀釋したものについて血球計算法と同樣にして單位容積の腹水中の細胞數を算定した．原腹水は定量的に採取してあるから稀釋倍數を乘ずることによつて原腹水單位容積中のDNA含量卽ちDNA濃度を，更に單位容積の腹水中のDNA含量と細胞數から計算によつて，細胞1個あたりの平均DNA含量を求め得る．

DNA定量[1]：核酸劃分の抽出には Schneider 法を用い，5％熱三鹽化醋酸にて抽出した液について DNA を Dische 法にて比色定量した．DNA量の表現にはすべてその燐量を用いた．

尙X線照射群の腹水細胞1個あたりのDNA含量測定には次の操作を加えた．卽ち前述の細胞均等浮游液を約500r.p.m. で遠心沈澱を繰返し，可及的に細胞破片を取り除いたものについて上記の定量を實施した．これはX線照射によつて細胞破壞が起り，多數の細胞破片を混ずる[26]結果細胞數の算定を困難にするのみならずDNA量をも不正確にするからである．

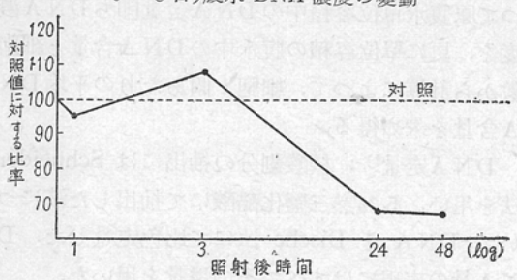
B．實驗成績

1) DNA濃度

對照として吉田肉腫移植後日數を追つてDNA量の測定を行つたところ，個體による變動が相當大きいが，日數の經過と共に增加の傾向がみられる．

X線照射によるDNA量の變動を觀察するには同一動物について照射前と照射後の値を測定するのが正當であるが，X線照射によつて腹水が減少するため多くの動物に於いて實際照射前，後の2回に亙つての定量に供し得るだけの腹水が得難い．そこで移植後6～8日に同一動物について24及び48時間の間隔を置いて2回腹水を採取しDNA含量測定の結果兩者の値に著差がないことがわかつたので，後述の如く細胞1個當りのDNA含量が一定とみなし得ることより照射前の對照値としてはこれに細胞數を乘じた値（DNA濃度）を以つて表わすこととし，從つて照射前には細胞數算定の爲の少量の腹水採取に止め，照射後のDNA量實測に充分な腹水を採取し得るようにした．斯くしてX線 500r 全身照射後の測定成績は第1圖に示す如くである．

第1圖 500r 全身照射吉田肉腫（移植後6～8日）腹水 DNA 濃度の變動



圖に於いて對照値を 100とし，照射後1時間，3時間，24時間，48時間，の値を對照値との比率で示した．1時間後輕度の減少，3時間後やゝ增加，24時間及び48時間後は30%以上の減少を示している．

2) 細胞1個あたりの平均DNA-P含量

第1表aに示す如くDNA-P含量の移植後 6, 7, 8 日では1.02～0.94×10^6 μg の間にあり略ゝ安定した値を示す．

照射群については，照射後1時間，3時間及び24時間の測定では殆んど差はなく，非照射群と比較しても有意な差があるとは云えない．

第1表 (a) 吉田肉腫（移植後6～8日）細胞1個あたりの平均 DNA-P 含量

移植後日數	動物數	DNA-P×10^{-6} μg/cell
6	5	0.94
7	6	1.02
8	6	0.92

(b) 500r 全身照射吉田肉腫（移植後6～8日）細胞1個あたりの平均 DNA-P 含量

照射後時間	動物數	DNA-P×10^{-6} μg/cell
1	5	0.96
3	5	0.96
24	5	0.95

II Ehrlich 腹水癌

A 實驗方法及び材料

實驗動物として約20 g（均一系，雌雄の區別なし）のマウスを用いた．移植後1週間目のEhrlich腹水癌腹水 0.1cc(腫瘍細胞約 0.1～10×10^6個)を腹腔内に移植し，腹水の充分に貯溜した8～11日目の動物について實驗を行つた．

X線照射條件：二次電壓180kVp, 管電流15mA, Cu 0.5㎜+Al 0.5㎜, 焦點動物間距離30㎝, 120 r/min, 照射線量 250r, 500r, 750r, 1000r, 全身一回照射．

すべて同一動物について，照射前，照射後，24時間及び48時間に腹水を採取しDNA含量を測定，尙非照射群についても同様逐時的な測定を行つた．

抽出及び定量法：Iの場合と同様に行つた．

B實驗成績

1)　DNA濃度

移植後の日數によるDNA濃度の變動

照射實驗に於いては同一動物から前後3回の腹水採取を要する關係上時期を選ぶ必要がある．從つて移植後8日目以後に第1回腹水採取を行い測定した．その成績は第2表a及びbに示す如くで8日目からはじめたものでは第2回の採取腹水にはDNAの增加の傾向がみられるが，10日目からはじめたものでは，輕度の增加を示すか，或いは殆んど變動がないと考えてよい様な測定値を得た．

X線照射によるDNA濃度の變動

對照値に於いても個體によつて，かなりの差異があり，またX線照射による影響についても相當の個體差が認められたが，變動の傾向は推定し得る．

250r 照射群：第3表に示す如く照射前，照射後24時間，48時間のDNA濃度に殆んど認むべき差がない．一部に增加の傾向を示すものもあるが，非照射群に比して輕度である．

第2表（a）　移植後の日數による Ehrlich 腹水癌 DNA 濃度の變動
（腹水採取間隔24時間）

動物番號	移植後日數	DNA-P μg/ml 第1回採取腹水	第2回（48時間後）採取腹水
1	10	144.2	138.5
2	10	190.7	178.1
3	10	187.6	198.2
4	10	139.4	148.6
5	10	199.0	212.0
6	10	205.8	201.1
7	10	256.5	299.5
8	9	230.7	230.3
9	11	238.2	238.1
10	11	210.7	219.5

（b）　移植後日數による Ehrlich 腹水癌 DNA 濃度の變動（腹水採取間隔48時間）

動物番號	移植後日數	DNA-P μg/ml 第1回採取腹水	第2回（48時間後）採取腹水
1	8	185.4	161.9
2	8	185.4	181.7
3	8	159.6	175.8
4	8	186.2	187.4
5	8	149.2	169.2
6	8	141.2	172.2.
7	8	197.1	192.8
8	8	145.6	177.1
9	11	167.7	170.7
10	11	238.2	244.0

第3表　250r 全身照射後の Ehrlich 腹水癌（移植後10日）DNA 濃度の變動

動物番號	照射前	24時間後	48時間後
1	194.0	194.0	
2	278.8	247.4	251.7
3	116.5	125.8	125.8
4	185.4	197.7	189.7
5	125.8	125.8	

値は DNA-P μg/ml

第4表　500r 全身照射後の Ehrlich 腹水癌（移植後10日）DNA 濃度の變動

動物番號	照射前	24時間後	48時間後
1	270.5	261.7	239.2
2	207.8	177.6	168.9
3	221.0	208.8	191.1
4	263.4	231.5	
5	177.4	141.1	133.4
6	185.6	159.6	133.5
7	141.1	137.3	125.8
8	221.9	159.1	162.9
9	226.8	201.3	194.9
10	249.7	237.2	186.7
11	226.4	144.9	167.4
12	227.9	223.3	209.6

値は DNA-P μg/ml

500r 照射群：DNA濃度の變動は第4表に示す如く，照射前に比し24時間或は48時間に於て最高約30%，最底3%の減少を示し，平均24時間後12%，48時間後17%の減少となる．

750r 照射群：第5表に見られる如く 500r 照射群と略ゝ同樣な減少を示す測定値を得た．この場合も個體差は認められたが照射前に比し平均24時間後14%，48時間後16%の減少を示している．この場合24時間と48時間との差は有意ではない樣に考えられる．

第5表 750r 全身照射後の Ehrlich 腹水癌（移植後10日）DNA 濃度の變動

動物番號	照射前	24時間後	48時間後
1	177.9	144.0	
2	179.4	147.2	162.5
3	200.9	177.9	147.2
4	161.0	142.0	147.2
5	122.7	111.9	
6	136.7	93.0	81.6
7	148.1	120.8	131.2
8	138.3	112.8	117.6
9	210.1	192.6	196.8
10	142.7	150.0	133.8

値は DNA-P μg/ml

1000r 照射群：DNA濃度の變動は前回までの照射群と比較して更に著明な減少を示している．第6表に見られる如く最高60%にも達する甚だしき減少を呈するものもあつたが，24時間後で平均約34%の減少を認めた．尙48時間の値については大線量での全身照射の爲死亡を來す例も多く，少數例に於て測定し得たに過ぎないないので確實な斷定を下すことは出來ないが，500r，750r，照射群と同樣の傾向を示すものと推定される．

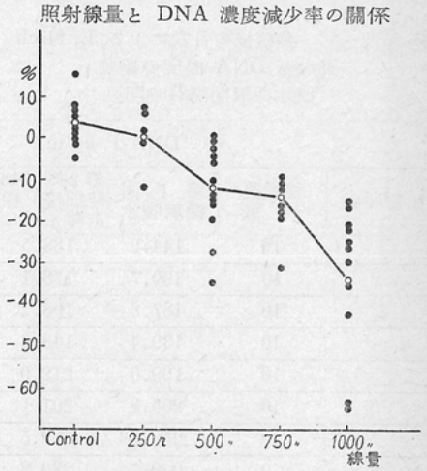
第6表 1000r 全身照射後の Ehrlich 腹水癌（移植後10日）DNA 濃度の變動

動物番號	照 射 前	24 時 間 後
1	197.1	69.4
2	174.0	112.4
3	171.4	125.9
4	202.1	58.9
5	174.4	144.7
6	116.0	90.3
7	214.2	149.3
8	209.3	191.5
9	171.5	127.3
10	200.5	111.8

DNA-P μg/ml

以上の實驗より照射後24時間に於ける照射線量と平均減少率との關係を檢討するに第2圖に示す如くで 500r と 750r との間の差は比較的少ないが，略ゝ一定の減少傾向がみられ，照射線量の增加と共に減少率の增加することを認め得る．

第2圖 Ehrlich 腹水癌に於ける全身照射線量と DNA 濃度減少率の關係

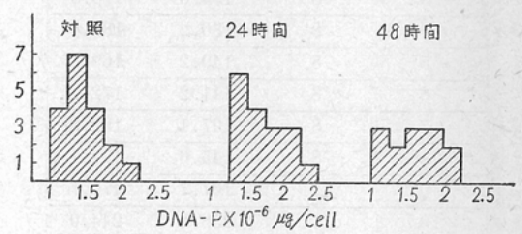


2) 胞細1個あたりの平均DNA-P含量

Ehrlich 腹水癌では照射による細胞破壞が少ないので． 細胞1個あたりの平均DNA-P含量の測定は吉田肉腫に比し容易であつた．

500r 1回全身照射せる場合の値は第3圖に示す如くで， 照射前DNA-P含量は1.15～ 2.1×

第3圖 500r 全身照射 Ehrlich 腹水癌（移植後10日）の細胞1個あたりの平均 DNA-P 含量



10^{-6} μg，平均 1.5×10^{-6} μg で，24時間後では $1.4\sim2.4\times10^{-6}$ μg 平均1.7×10^{-6} μg である．48 時間後では $1.1\sim 2.1\times10^{-6}$ μg，平均 1.5×10^{-6} μg の値を示し，照射前．照射後24時間及び48時間の値の間には著明な差はみられず略ゝ一定していると云える．

考　按

1)　X線のDNA含量に及ぼす影響に就て

生體の組織細胞内核酸含量に對する放射線の影響については，現在までの研究結果はまちまちで必ずしも一致しているとは言えない．

組織細胞内におけるDNA代謝に及ぼす影響については放射性同位元素 P^{32} 或は C^{14}) を用いての報告[11)15)27)]があるが，化學的定量によつた報告では H, Harrington and P. Lavik[28)29)] がラツテの胸線，脾臓等の淋巴組織の P^{32} の toxic dose の照射により全 DNA-P 量の著明な減少を示したが，核1個あたりのDNA－P量は變化を認めなかつた．K. Paign and B.N. Kaufmann[16)] はマウスに 600rを全身照射し，その肝臓の核酸量を照射後經時的に定量しDNA，RNA共に同一傾向をもつて初期にやゝ減少し，12時間で舊に復し18時間で著しい減少を來すことを認めた．マウス，ラツテを用いての杉山及び著者等の研究[30)]は斯る變化を認めていない．又 N.T. Harrington and R.W. Koza[31)] は Feulgen 反應並びにメチールグリユン染色を用い顯微測光的に定量したバッタの胎兒の核では4000r，10000r，125000rでも核1個あたりのDNA含量には變化を認めないが，DNAの解重合は起るのであろうと述べている．G. Klein and Forssberg[23)] は Ehrlich 腹水癌を用いて，その細胞の化學的成分に及ぼすX線の影響を追求し，1250r 腹腔照射によつてRNA，全窒素量は照射後の細胞容積の増大に應じて増加するがDNAには殆んど變化を認めていない．

又 Gardella[5)6)] は吉田肉腫を用い，1000r 照射17～24時間後の核酸量を照射前の値と比較しているが，同様細胞1個あたりの平均DNA量には變化を認めなかつた．但し彼の實驗に於いては照射によつて起る細胞破片の處置が全然考慮せられていない．

要するに此等の結果はDNA濃度では著明な變化を認めているが，細胞1個宛平均DNA量は變化がないことに於て一致している．本實驗に於いても吉田肉腫および Ehrlich 腹水癌，何れも程度の差こそあれ，X線照射によつてDNA濃度の減少を認めたが，細胞1個あたりの平均DNA-P含量は略ゝ一定であると考え得る値を得た．

尙照射後24時間，48時間の測定値に殆んど著差を見出し難いことより，照射により障碍された細胞は少くとも24時間頃までに破壞され，DNAの分解吸收も24時間前後で終了するらしくみえる．但し本實驗の場合のDNA濃度とは腹水含量についての値で，重量あたりのものとやゝ趣を異にしていることを附加しておく．

2)　DNA量を以てするX線の生物學的作用の定量的表現の可能性の問題について

癌細胞の増殖の一つの指標として，全DNA含量を以てすることに關して既に2～3の報告[25)32)33)]が見られる．此れは細胞1個あたりの平均DNA含量が一定であることを基礎として細胞數の表現に代用されるもので極めて妥當且つ有利な方法と考えられる．放射線を生體に照射した際に起る細胞の障碍の程度の指標として，DNA量が用い得るのではないかと云う點も本研究の目的の一つである．

Cole 等は[34)] 放射線障碍に對する生物學的防禦物質の研究に際し，その防禦効果の判定に脾臓のDNA量の減少の抑制或は恢復を指標として觀察し有意な業績をあげている．

本實驗では Ehrlich 腹水癌を用いて照射X線量とDNA濃度の減少との關係をみるために，段階的に 250r，500r，750r，1000r を照射して實驗し，500r と 750r との間に顯著な差を認め得なかつたが，略ゝ線量の増加するに從つて減少率が増大するような成績を得た．然し個體差が相當著しいので多數例について觀察しなければ容易に斷定し難い．

Ehrlich 腹水癌の如き放射線の感受性の稍ゝ低いものでなく相當感受性の高い，而も對照値が比

較的安定せる組織を用いたならばX線の生物學的作用の極めて適切な指標となり得ると思われる．これは著者等が[30]先に行つた脾臓，鷄胎組織を用いての實驗によつても知られるところである．DNA濃度は減少するが細胞1個當りの平均DNA含量には變動がないと言うことは，卽ち死滅破壞した場合DNA含量は減少するが，生存する細胞についてはDNA含量に變化の起らなかつた事を意味し，組織内の何%かの細胞が破壞せられた場合に，濃度にその細胞の含有していただけのDNA量の減少が起るということである．

卽ちX線照射によつて形態學的變化の少ない換言すれば，感受性の低い組織ではDNA濃度の變化も少く，感受性の高い組織では減少は著しい筈である．

このことはEhrlich腹水癌と吉田肉腫との比較によつても首肯せられる．

但し形態學的變化の推移と，DNA濃度の變動が平行するか否か，またどの程度にまで細胞の破壞が進行した時に，その細胞1個あたりの平均DNA量の減少を現わしてくるかは，更に研究を進めなければならない問題であらう

以上DNA濃度を以て，X線による細胞破壞度の指標とする可能性は相當確實と考えられ，實驗材料の撰擇が問題を解く鍵と思われる

結　論

1. 腫瘍細胞のDNA量に對するX線の影響を觀察せんとし，吉田肉腫及びEhrlich腹水癌について，全身照射後のDNA含量の變動を觀察し，更に照射線量とDNA濃度の變動率との關係を追求した

2. 吉田肉腫に於ては，DNA濃度はX線500r全身照射24乃至48時間後可成り著明な減少を認める．Ehrlich腹水癌に於ては，DNA濃度はX線1000r全身照射に於いて24乃至48時間後これと匹適する減少を認める

3. 吉田肉腫に於ても，Ehrlich腹水癌に於いても，細胞1個あたりの平均DNA－P含量はX線500r全身照射，24乃至48時間後變動を認めない．

4. Ehrlich腹水癌に於いて照射線量とDNA濃度減少率の關係を追求し兩者の間に一定の相關性の存在を認めた　これによつてDNA量がX線の生物學的作用の指標となり得ることの確信を得た

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた西岡教授，永井助教授並に三浦博士に謝意を表す．

尙Ehrlich腹水癌を惠與されし第一病理宮地教授に深謝する．

文　獻

1) 江上不二夫編：核酸及び核蛋白質，共立出版，1951. —2) 村地孝一：現代自然科學(9)，弘文堂，1953. —3) Fellas, V.M., I. Meschan, P.L. Day and C.D. Douglass: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 87:231～233, 1954. —4) Kelly, I. S, and H.B. Jones: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 74: 493～497, 1950. —5) Gardella, J.W, and Eleanor J. Lichtler: Cancer Res. 15(8):529～531, 1955. —6) Gardella, J.W., and Lichts J. Eloanor: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1:15～16, 1954. —7) Stowell, R.E.: Cancer Res. 1: 169～178, 1945. —8) Ely, T.O., and M.H. Ross: Cancer Res. 8:285～294, 1948. —9) Abrams, R.: Arch. Biochem. 30:90～99, 1951. —10) Paigen, K, & B.N. Kaufmann: J. Cell. & Comp. physiol. 42(2):163～178, 1953. —11) Hevesy, G.: Nature. 163:869～70, 1949. —12) Hammersten, E, and Hevesy, G.: Acta physiol. Scandinav. 11:335～43, 1946. —13) Stowell, R.E.: Symposia. Soc. Exy. Biol. 1:190～206, 1947. —14) Reinhard, M.C., H.L. Golty and S.G. Warner: Federation Proc. 13:186, 1954. —15) Forssberg. A. and G. Klein: Radioisotope Confernce. 1:232～242, 1954. —16) Hotmann, D.: Strahlentherapie, 95:209～214, 1954. —17) Lorenz, W.: Ztschr. f. Krebsforsch. 50:234～238, 1954. —18) Bäumer, J, D, Hotmann, und R.K. Kepp: Strahlentherapie. 92 (1):25～32, 1953. —19) Forssberg, A, and G. Klein: Acta Radiol. Suppl. László, 116: 689～690, 1954. —20) Laszlo Révész: J. Nat. cancer ints. 15(6):1671～1702, 1955. —21) Lasuitzki, Ilse: Brit. J. Radiol. 27:228～235, 1954. —22)Zeitz. H, and K. Fendel: Ztschr. f. Krebsforsch. 59(4): 516～526, 1953. —23) Klein, G, and A. Forssberg: Exp. Cell. Res. 6:211～220, 1954— 24) Leonard, G., E, Klein, and G. Klein: Exp. Cell Res. 1(4):544～570, 1950. —25) Klein. G.: Exp. Cell Res. 2(3):518～573, 1951, —26) Nagai, S.H, Matsuda, K. Akita and T. Kasue:

Med. J. Osaka Univ. 5(4):749～762, 1954. —27) Holmes, B.E.: Brit. J. Radiol. 20:450～453, 1949. — 28) Harrington, H. and P. Lavik: Fed. Proc. 10:194～195, 1951a. — 29) Harrington, H. and P. Laoik: U.S. Atomic Energy Comm. unclassif. Rep. Nyo. 1627, 1951b. —30) 永井春三: 日本醫事新報, 1537號, 27～30, 1953. —31) Harrington, N.J. and R.W. Koza: Biol. Bull. 101:139～150, 1950. — 32) 寺島寛, 河野修, 猿山義雄, 宮地徹, 植村富士男, 妹尾亘明, 芝野新: 癌, 44:286～288, 1953. — 33) 芝野新一, 宮地徹, 寺島寛, 松尾晴夫, 植村富士男, 石田博明: 癌, 44: 380～381, 1953. — 34) Cole, L.J, and M. Ellis: Cancer Res. 14(10):738～744, 1954.

Effects of X-Radiation on the Deoxyribonucleic Acid (DNA) Content of the Ascites Tumor.

By

Itsuo Kawamoto

From the Department of Radiology, Osaka University Medical School

Director: Prof. T. Nishioka

The change of the ascitic DNA content following single whole-body x-irradiation was chemically determined in the Yoshida sarcoma and the Ehrlich ascites carcinoma. The asciticDNA content was measured by means of quantitative investigation of DNA-P concentration and DNA-P content per cell.

In the Yoshida sarcoma, at twenty four hours after 500r exposure, the ascitic DNA concentration was found to be decreased considerably, but the DNA content per cell was found to remain unchanged.

In the Ehrlich carcinoma, the ascitic DNA concentration decreased in proportion to increase of X-ray dosage and then the value following 1000r exposure showed the same with that following 500r exposure in the Yoshida sarcoma. This result showed that the Yoshida sarcoma was more radiosensitive than the Ehrlich carcinoma. The DNA content per cell of Ehrlich carcinoma was also unchanged by 500r exposure.

The author believed that the measurement of the ascitic DNA content was an useful method as an index of the biological effect of radiation.