



Title	生体組織に対するX線照射の影響 : 結合水についての 実験
Author(s)	岡本, 和男
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1962, 21(12), p. 1179- 1192
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19694
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

生体組織に対する X 線照射の影響

結合水についての実験

徳島大学医学部放射線医学教室（主任 河村文夫教授）

大学院学生 岡 本 和 男

（昭和37年2月1日受付）

The Influence of X-ray Irradiation on the Living Tissues.

Experiments on the Bound Water

By

Kazuo Okamoto

Department of Radiology, School of Medicine, Tokushima University.

(Director: Prof. Dr. Fumio Kawamura)

The effects of X-ray irradiation on bound water in living tissue were studied by vapour pressure method.

The results obtained are follows.

1. The amount of bound water in various living tissues, such as rat muscle tissue, rat liver tissue, MTK-sarcoma III rat ascites tumor and rat red cell, after X-ray 500-4000 r irradiation, increased clearly compared with that of before irradiation.

2. The experimental data were analysed by means of the theory of BET multilayer adsorption. The increase of the bound water of various living tissues by X-ray irradiation might be related to the increase of free polar radicals capable of hydrogen bond building.

緒 論

放射線の生細胞に対する影響については、形態及び機能の面より¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾、かなり明らかにされている。照射により細胞内に起り得る化学的あるいは物理化学的に²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾大量線量照射の場合を除いて、所謂治療線量照射に起る変化については余り知られていない¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。

最近放射線化学の進歩により、殊に酵素系¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾²³⁾²⁴⁾に対する放射線の作用が注目され、実験的にもX線照射による生体内酵素の変化が報告

されている。しかしX線照射直後の変化については、この程度の線量では変化がないという報告が多い¹⁾³⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾。

教室のこれまでの報告では、形態学的には、X線照射直後より細胞質等に著明な構造の変化が見られるという⁷⁾⁸⁾²³⁾。この原因は明らかにされていない。数百レントゲン程度の線量で見られる細胞の形態的变化は、的弾説あるいは放射線化学の立場からはそれを構成する核酸、酵素、蛋白質等の不可逆的变化は無視し得る程度であるので説明は困難である⁹⁾¹⁵⁾。

生体を構成する物質の中で水は半ば以上を占め³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾⁵²⁾、その中のある部分は所謂結合水として生体の重要な構成成分となっているものと考えられる。殊に生理的に活発な細胞に存在するザルミン、ミオジン、コラーゲン、DNA等は極めて多量の結合水を有すると云われている²⁹⁾⁵²⁾。この結合水は、水素結合であると推定されている³⁹⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁵³⁾。これが物質内の $-OH$ 、 $=CO$ 、 $-COOH$ 、 $=NH$ 、 $-NH_2$ 等の極性基と水素結合を作り、DNA、ゼラチン等の重合に見られる如く、生体の巨大分子に關与していると考えられる。しかもこの結合のエネルギーが数 kcal/mol 程度²⁹⁾³³⁾⁴⁰⁾である事から考えて、放射線エネルギー吸収による生体の可能な反応の一つとも考えられている。

本実験においては、照射後直ちに起る物質的变化の一つとして結合水の変化について追究した。

これまでの蒸気圧法結合水測定法を³⁵⁾³⁹⁾⁵³⁾改良し生体を取りだし、直ちに測定し所謂生体の結合水を測定する事が可能となつたので、種々な臓器に対する照射の影響について検討した。先ず結合水の状態の明らかな筋肉組織³³⁾³⁵⁾⁵²⁾、実質臓器として肝臓組織、細胞として腫瘍細胞、更に照射による変化のよく知られている赤血球について⁵³⁾⁵⁴⁾ X線照射による直後の結合水の状態を検討した。

実験方法

結合水測定法として蒸気圧法を用いた。

蒸気圧法結合水測定法は適時試料の含水重量と、その時の試料平衡飽和水蒸気圧とを測定し、所謂等温水蒸気圧曲線を求め、これより結合水量及び結合エネルギーを求める方法である。測定装置は河村、広田の方法(1951)³³⁾³⁵⁾³⁹⁾⁵²⁾⁵³⁾を改良し、第1図の如き構成を示し、装置全体は空気恒温槽内に封入した。試料は、ガラス測定室内の試料皿にのせ封入する。真空ポンプにて排気し、試料の蒸発凍結を待つて排気コック(A)を閉じ、測定回路を独立せしめ以下測定の終了まで同様の状態を継続した。この状態に於ては空気圧は略 10^{-3} mmHg である。

(B)は内径4 cm、長さ12cmのガラス製円筒の吸水室で内部に長さ10cm、巾3cmのガラス皿に5酸化磷(無水磷酸)(P_2O_5)15~20 g⁴¹⁾をひろげ、2~3回実験終了後コック(C)より P_2O_5 を取り変える。(D)は内径4 cm、長さ30cmのガラス製円筒の試料重量測定室で、内部に径0.5mmの銅線バネ秤と寒暖計が封入されている。試料の回路内への出入は、コック(E)より行なわれる。試料皿に寒暖計の下端を近づけ測定値の温度補正に使用する⁴²⁾。

水蒸気圧の測定は、水銀気圧計法に依つた。吸

Fig. 1. Apparatus for the estimation method of bound water by vapour pressure method

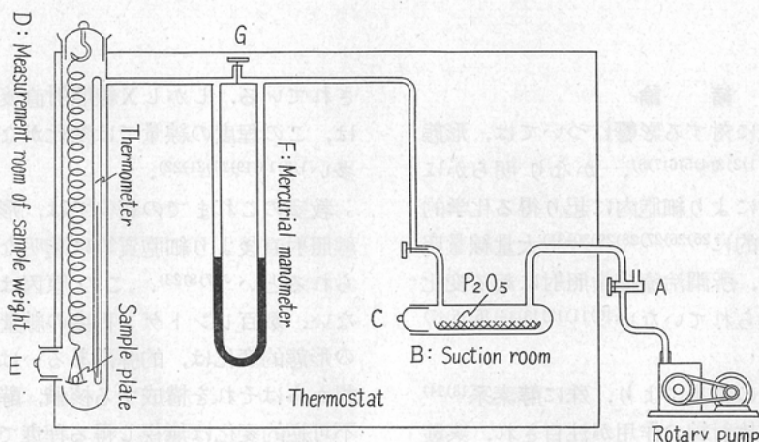
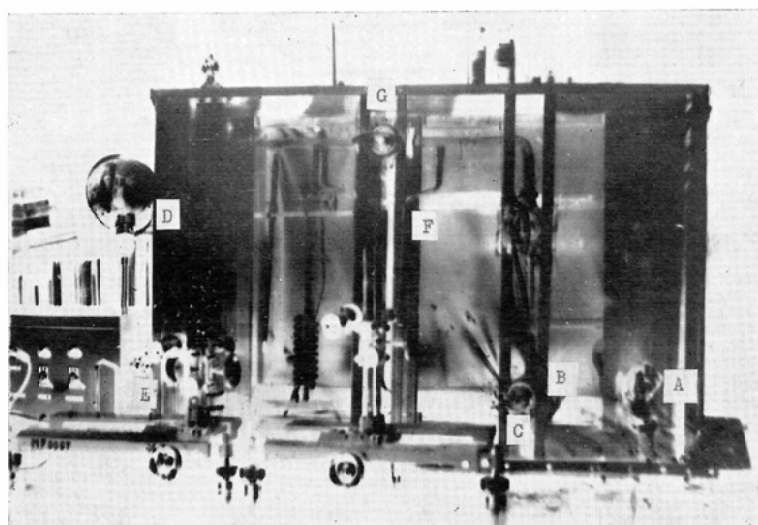


Fig. 2. Photograph of the measurement apparatus



水室 (B) と試料重量測定室 (D) との回路の中間に水銀気圧計 (F) を入れる。水銀気圧計は、径 5 mm のガラス製 U 字管内に精製水銀が入れている。恒温槽は $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の動揺の範囲に調節してある。

水銀柱の読みは、第 2 図の写真の如く読み取り顕微鏡において、 10^{-2}mm まで正確に読みとることが出事、実験に用いた 25°C 飽和水蒸気圧は、 23.51 mmHg であるので活性度にして 10^{-3} まで測定し得る。

試料重量の測定は、自家製作のバネ秤によつた。これまでの試料の測定には多くの難点があつたが⁵²⁾、本実験の方法によつて連続的に適時測定が行い得る点で優れている。

測定時における容器内圧は、 $10^{-1} \sim 10^{-3}\text{ mmHg}$ で、浮力の影響は少なく、従つて体積による重量差は無視し得る。

封入バネ秤の感度曲線は、第 3 図、第 4 図の如くである。感度曲線は化学天秤の 1 mg より 100 mg の分銅を用いて作製したが、 1 mg より 100 mg に至る広い範囲に互に、0 点より始まるきれいな直線を示している。 100 mg における振れは、 15.5 mm で 1 mg の重量増加は、 0.155 mm に相当する。バネ秤の収縮の度は、同じく読み取り顕微鏡を使用し、

Fig. 3. The sensitive curve of spring balance (1-10mg)

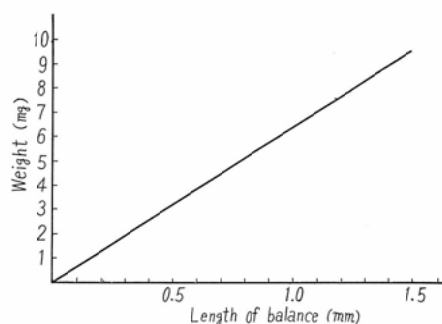
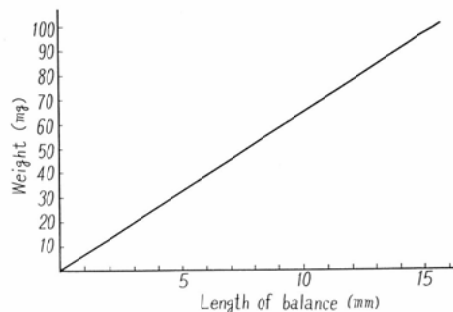


Fig. 4. The sensitive curve of spring balance (10-100mg)



10^{-2}mm までの差を正確に読み取る事が出事るので実験には $1 \sim 2\text{ mg}$ の生の試料を用いて 10^{-2}mg まで正確に求める事が出来た。

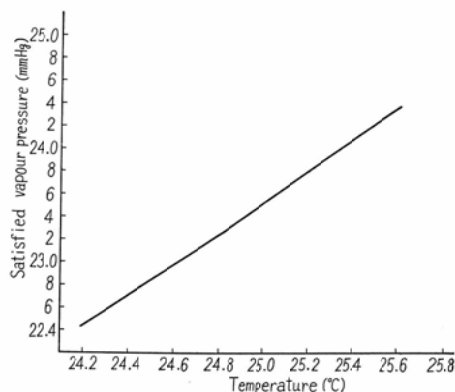
脱水方法としては、5 酸化燐法⁴¹⁾を用いた。五酸化燐の脱水能力は、空気 1 立中に 0.0002mg 以下の水を残すのみである。他の種々なる脱水剤に比較して極めて強力である。五酸化燐を用いた場合の残存水蒸気圧は、 2.0×10^{-4} mmHg 以下で、測定に用いた 25°C における飽和水蒸気圧に比し $1/10^3$ の値を示し、必要な活性度（試料水蒸気圧/測定温度における飽和水蒸気圧）に比し、二桁小で十分実験に使用し得る。

試料により全く水を除去した所謂乾物重量⁵²⁾は、必要な測定を終了した後、回路内のコックをすべて開き五酸化燐に水を吸収せしめる。使用した試料量では、開放後略 3 時間後より 48 時間に至るも試料重量に変化はなく、3 時間以上の五酸化燐脱水で完全に水が除去される。他の高温乾燥法、低压吸引乾燥法等種々なる乾物重量測定法があるが、それぞれ難点が指摘されている⁵²⁾。五酸化燐 3 時間乾燥重量は、100°C、24 時間乾燥により変化しない事をたしかめ得たので、以下の実験においては五酸化燐 3 時間乾燥法により乾燥重量を求めた。実験には 25°C に於いて実験した。25°C においては、種々なる酵素による時間的变化が起る事が考えられるが、用いた蒸気圧法では、試料封入後直ちに真空ポンプ排気により凍結乾燥し、溶液としての水は、除去される為時間的变化が避けられる。25°C における飽和水蒸気圧は、10°C の 2.4 倍、20°C の 1.4 倍の値を示し、測定が容易な事及び年間室温実験が可能なる事により、25°C において実験を継続した。

実験動物として Wistar 系成熟ラットを用いた。各種試料は、生体より無麻酔下において採取した。採取後直ちに細分、分離し、1~2 mg の試料を薄いガラス製容器に入れ、これを測定器内の試料皿にのせる。真空グリースにて測定器内を気密にし、直ちに真空ポンプにて回路内の排気を行なう。試料は減圧排気により水は蒸発し、凍結する。更に 1~2 分排気をつづけ次いで排気コックを閉じ、測定回路を閉じる。回路内においては空気等の蒸気圧は以後一定の低压に保たれる。試料の適当な重量減少時に、気圧計回路をコック (G)

によりとじる。試料側の回路では、試料と平衡せる水蒸気圧を示し、吸水室側の水蒸気圧は、五酸化燐により殆んど無視し得る (2×10^{-4} mmHg)。第 1 回目の試料を封入してから蒸気圧が一定の値を示めず時間は 90~120 分で、以下の実験においては、2 時間の飽和時間を取り、2 回目以後は、1.5 時間の飽和時間を取った。測定時の試料皿の部における温度を寒暖計にて読み、必要な温度補正を第 5 図により行なつた。飽和蒸気圧を測定した後、コック (G) を開き左右の水銀気圧計回路を同通せしめると、水銀柱は 0 位にもどる。五酸化燐に吸収される回路内の水を補う為、試料より水の蒸発が起り試料重量は更に減少する。適時水銀気圧計コックを閉じ、次の測定を開始する。

Fig. 5. The amendment curve of relation between saturated vapour pressure and temperature



このような操作をくりかえし、活性度 0.1 以下に至れば、水銀気圧計コックを開放し 3 時間放置した後、試料重量を測定し乾燥重量とした。

ラット筋肉組織についての実験

照射による生体組織の結合水に対する影響を検索するために、先ず筋肉組織について実験を行つた³³⁾³⁵⁾⁴⁵⁾⁵²⁾。

筋肉組織は生理的にも活発な活動を行う組織であり、特に多量の結合水を有する事が知られている⁴⁴⁾⁵²⁾。

実験材料として、成熟ラット縫工筋を使用し

た。被験ラツテを固定し皮膚切開を加え、縫工筋を露出しその筋腹より筋肉組織を小尖刀で、数mgを切り取り、直ちに小ピンセットにて筋線維を細分離し、測定皿にのせ実験に供した。測定に使用せる筋肉組織は1mg前後である。

X線照射は、ラツテを背位に緊縛固定し、一侧大腿部に約 4×4 (cm²)の照射野に照射した。照射条件は、X線深部治療装置(信愛号)にて180 Kv, 半価層1.0mmCu, 焦点被射体距離20cm, 200r/分にて 4×10^3 r 一回照射を実施した。照射後直ちに測定を開始した。

試料を試料重量測定室に封入後、直ちに真空ポンプにて測定回路内の排気を開始するに新鮮非照射筋肉組織においては、直ちに乾物様に乾燥し照射例においては、凍結し乾燥が遅れる点において肉眼的に差が見られた。

実験結果

筋肉組織の結合水

縦軸に乾燥筋肉組織1グラムに結合せる水のグラム数(g)を取り、横軸に25°Cに於ける水の飽和水蒸気圧 (P_0) と試料と平衡せる飽和水蒸気圧 (P) との比 (P/P_0) の値を活性度 (a) として表わして図示すると、第6図の如き等温水蒸気圧曲線を得る。この活性度は、試料の水に対する親和力の程度を表わすものと考えられているものである。

Fig. 6. Isothermic vapour pressure curve for rat muscle tissue (25°C°)

F: Non-irradiated muscle tissue

R: After 4×10^3 r irradiation on muscle tissue

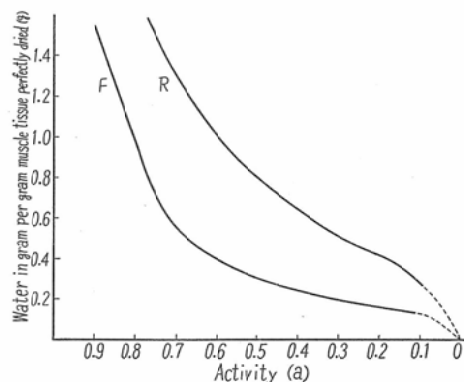


Fig. 7.

F: Non-irradiated muscle tissue

R: After 4×10^3 r irradiation on muscle tissue

P: 24 hours after 4×10^3 r irradiation on muscle tissue

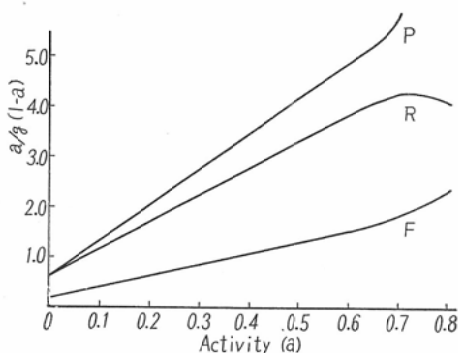
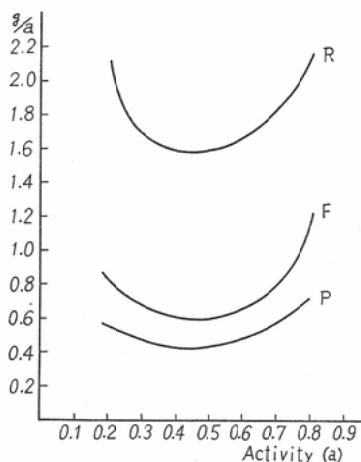


Fig. 8.

F: Non-irradiated muscle tissue

R: After 4×10^3 r irradiation on muscle tissue

P: 24 hours after 4×10^3 r irradiation on muscle tissue



この図について見るに活性度 0.9においては、乾物筋肉組織1グラムに結合せる水の量は1.6g, 活性度 0.8にては約1g, 活性度の 0.7にては0.55gで、曲線は活性度 0.7前後までは傾斜が急で水のグラム数の減少が著るしい。活性度 0.6においては、乾物筋肉組織1グラムに結合せる水の量は0.40g, 活性度 0.4にて0.24g, 活性度 0.2にて0.16gで、活性度 0.7~0.2前後の範囲においては、わずかの含水量の変化に対し、活性

性は著しく減少する平坦部を形成する。

この等温水蒸気圧曲線について、結合水を吸着水と考え、所謂 B.E.T. の多層吸着理論を適用して解析した⁽⁴³⁾⁽⁵²⁾。一定の水蒸気圧 (P) における乾物 1 グラムに対する吸着水分量 (g) は次式で与えられる。

$$\frac{P}{g(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \frac{P}{P_0} \dots\dots(1)$$

P/P₀ は活性度 (a) であるから(1)式より

$$\frac{a}{g(1-a)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \cdot a \dots\dots(2)$$

この式で P₀ はその温度における水の飽和水蒸気圧で、P は測定物質に平衡せる飽和水蒸気圧である。V_m は単分子層としての最高吸着能力、(C) は一つの定数である。(2)式より明かなる如く、縦軸に a/g(1-a) を取り、横軸に活性度(a)をとれば結果は直線関係が成立するはずである。且つその直線が縦軸と交わる点より 1/V_mC を得、又直線の傾斜から C-1/V_mC が得られる。これから V_m と C とが実験的に求められる。V_m は極めて強い結合水を表わすものと考えられている。常数(C) については次式の関係がある。

$$C \sim e^{(E_1 - E_0)/QT} \dots\dots(3)$$

このところで E₁ は吸着単分子層における水の蒸発熱、E₀ は普通の状態における水の蒸発熱である。これより水が直接試料に結合する場合のエネルギーを求める事が出来る。

非照射の場合においては、第7図の如く活性度 0.1より0.65の範囲において明らかに直線関係が

成立し、これより第1表の如く一層の結合水量を示すと考えられる V_m は乾物 1 g に対して 0.19 g である、一層の結合水の結合エネルギー (E₁-E₀) は 1.4kcal/mol と計算され、水素結合のエネルギーの範囲にある⁽³⁵⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾。

縦軸に g/a、横軸に活性度 (a) を取れば、等温水蒸気圧曲線より第8図の如き曲線を得る事が出来、その最小の g/a を示す活性度より二層までに吸着している結合水量 (V_{m2}) を読み取る事が出来る。V_{m2} はラツテ筋肉組織においては、乾物 1 g に対し 0.27 g である。

所謂結合水量として、生理的にあるいは化学的に、あるいは、物理的に他の水とは異つた性質を持つことから、活性度 0.7以下の結合水量をもつて所謂結合水量とされている⁽⁵²⁾⁽⁹⁵⁾。

非照射ラツテ筋肉組織においては 0.55 g の値を示している。

一層の結合水量 (V_{m1}) と二層までの結合水量 (V_{m2}) との比 (V_{m2}/V_{m1}) の値は、1.4 で DN A, コラーゲン, ゼラチン等に近い 1.4 の値を示している。

X線 4 × 10³r 照射後における等温水蒸気圧曲線 (25°C) は第6図に示す如くである。活性度 0.8 に於ては乾物筋肉組織 1 g に結合せる水の量は 1.70 g、活性度 0.6にては約 1.0 g、活性度 0.4にては 0.63 g で、活性度 0.2にては 0.42 で、結合せる水量の減少と共に活性度は低下し、非照射例に比しいずれの活性度においても、結合せる水の

Table 1. Irradiation effects on the bound water for rat muscle tissue

	Amount of water in gram bound per gram dried sample			V _{m2} /V _{m1}	(E ₁ -E ₀) (Kcal/mol)
	(V _{m1})	(V _{m2})	Total bound water at a ≤ 0.7		
Non-irradiated	0.19	0.27	0.55	1.4	1.4
after 4X10 ³ r	0.41	0.78	1.30	1.9	1.4
24 h. After 4X10 ³ r	0.12	0.22	0.40	1.8	1.5

V_{m1} showing the amount of bound water at the first layer, V_{m2} below the second layer, (E₁-E₀) the binding energy of first layer for bound water.

量は大きくなり、非照射例の如く、平坦部を作らない。

縦軸に $a/g(1-a)$ をとり横軸に活性度 (a) をとると、第7図に示す如く、活性度 0.7までは直線関係が成立し、これより第1表の如く一層の結合水量 (V_{m1}) は乾物 1 g 当り 0.41 g で、結合のエネルギーは 1.4 kcal/mol となる。二層までの結合水量を求めると、乾燥筋肉組織 1 g 当り 0.78 g となり、全結合水量 ($a \leq 0.7$) は 1.30 g となる。一層の結合水量 (V_{m1}) と二層までの結合水量 (V_{m2}) との比 (V_{m2}/V_{m1}) の値は、1.9 で略 2 に近くなる。

X線 4×10^3 r 照射により照射後一層の結合水量、二層までの結合水量、全結合水量共に非照射例に比して倍増し、照射により明らかに結合水量が増加した事を示している。蛋白質等においては³⁷⁾³⁸⁾ 結合水は水素結合を形成し得る極性基と水素結合を作ると推定されているので、この場合の一層の結合水の著しい増加は、此等水素結合を作り得る極性基の増加を示めすもので、照射により筋肉組織の構造が変化し、非照射の場合に比し、極性基の遊離の状態を推定せしめるものである。X線 4×10^3 r 照射後24時間においては、第1表の如く一層の結合水量は乾物 1 g 当り 0.12 g、二層までの結合水量 0.22 g、全結合水量は 0.40 g で、一層の結合水の結合エネルギーは 1.5 kcal/mol で、非照射の場合に比し軽度の結合水量の減少を示している。

X線 4×10^3 r 照射後48時間においては、非照射例と同様の値を示している。

筋肉結合水に対するX線照射の影響は、照射直後には著しい結合水量の増加を来し、24時間後、48時間後において回復していた。

ラット肝臓組織についての実験

ラット筋肉組織について、X線照射により明らかに結合水の増加を見たが、更に実質臓器として肝臓組織について実験を行つた。肝臓組織は、生体の代謝に極めて重要な役割をもち、又再生も盛んな組織である。これについて照射の影響を検討した。

実験材料として成熟ラット肝臓組織を使用した。ラットは背位に緊縛固定し 4×4 (cm²) の照射野で肝臓を含む上腹部を照射した。照射条件は筋肉組織についての条件と同様で、X線 2×10^3 r を1回照射した。照射には10分間を要した。照射後直ちに鋏刀にて開腹し、肝臓辺縁部を切り取り、生理食塩水にて血液を洗浄し、これを破碎して実験に使用した。測定には約 1 mg を使用した。測定に際し測定器内の排気により直ちに凍結し照射例と非照射例には、肉眼的には差は見られなかった。

Fig. 9. Isothermic vapour pressure curve for rat liver tissue (25°C)

F: Non-irradiated liver tissue

R: After 2×10^3 r irradiation on liver tissue

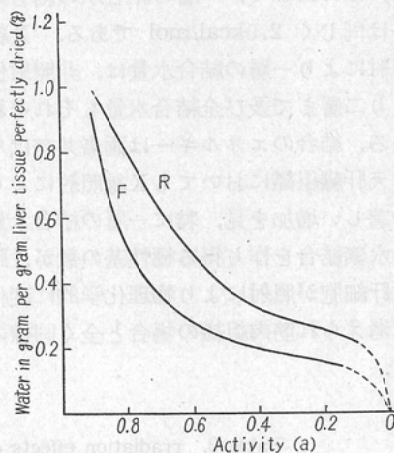


Table 2. Irradiation effects on the bound water for rat liver tissue

	Amount of water in gram bound per gram dried sample			V_{m2}/V_{m1}	(E_1-E_0) (Kcal/mol)
	(V_{m1})	(V_{m2})	Total bound water at $a \leq 0.7$		
Non-irradiated	0.11	0.23	0.35	2.0	2.0
After 2×10^3 r	0.22	0.41	0.61	2.0	2.0

実験結果

肝臓組織における25°Cにおける等温水蒸気圧曲線は第9図の如くである。非照射例においては、筋肉組織の場合と同じく活性度 0.7までは急激に水の量は減少し活性度 0.6より 0.2に至る間においては、結合せる水の量の減少は、わずかであるが、活性度は著明に減少する。X線 2×10^3 r 照射例においては、筋肉組織の場合と同じくいずれの活性度においても、結合せる水の量は対象例に比べ著しく増加している。

この曲線を筋肉組織の場合と同じく多層吸着理論式により解析すると、第2表の如く非照射例においては乾物、1gに対する一層の結合水量 (V_{m1}) は0.11 g, 二層までの結合水量 (V_{m2}) は0.23 g, 全結合水量 ($a \leq 0.7$) は0.35 gである。一層の結合水の結合エネルギーは 2.0kcal/mol でこの結合が同じく水素結合である事を示している。

X線 2×10^3 r 照射直後においては、乾物 1 g に対する一層の結合水量 (V_{m1}) は0.20 g, 二層までの結合水量 (V_{m2}) は0.41 g, 全結合水量 ($a \leq 0.7$) は0.61 gで、一層の結合水の結合のエネルギーは同じく 2.0kcal/mol である。X線 2×10^3 r 照射により一層の結合水量は、非照射例の2倍となり二層まで及び全結合水量もそれぞれ倍増している。結合のエネルギーは両者共差はない。

ラット肝臓組織においてもX線照射により結合水量の著しい増加を見、特に一層の結合水量の著増は、水素結合を作り得る極性基の数が、肝臓ないし肝細胞が照射により物理化学的に変化せるものと考えられ筋肉組織の場合と全く同様の変化である。

ラット腹水肉腫細胞についての実験

実質臓器である肝臓組織について、筋肉組織と同じくX線照射により、著明な結合水量の増加を見た。ついで遊離細胞である腹水肉腫細胞について検討を加えた。

細胞としてMTK・Ⅲラット腹水肉腫細胞を用いた。成熟 Wistar 系ラットにおいて腹腔内接種後5~7日目の腹水をガラスビベットにて採取し、生理食塩水にて3回洗浄後、手廻し遠心沈澱を試料として実験に使用した。試料は1回に1mg前後を使用した。

Fig. 10. Isothermic vapour pressure curve for tumor cell (25°C)

F: Non-irradiated tumor cell

R: After 2×10^3 r irradiation on tumor cell in vivo

R': After 2×10^3 r irradiation on tumor cell in vitro

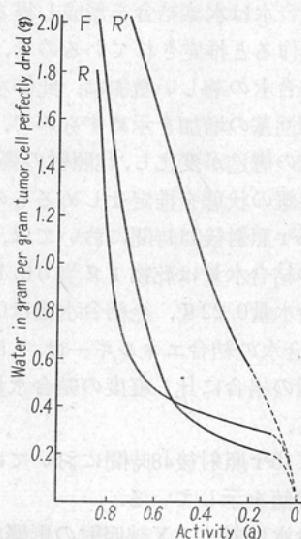


Table 3. Irradiation effects on the bound water for tumor cell (MTK III)

	Amount of water in gram bound per gram dried sample			V_{m2}/V_{m1}	(E_1-E_0) (Kcal/mol)
	(V_{m1})	(V_{m2})	Total bound water at $a \leq 0.7$		
Non-irradiated	0.22	0.35	1.02	1.6	1.6
After 2×10^3 r in vivo	0.24	0.48	0.62	2.0	1.4
After 2×10^3 r in vitro	0.73	0.89	1.96	1.2	1.1

生体内照射は肉腫接種ラツテを背位に固定し腹部のみを $4 \times 4 \text{ cm}^2$ の照射野で照射した。X線照射条件は、筋肉組織におけると同様で、 $2 \times 10^3 \text{ r}$ の照射には約10分を要した。

生体外照射実験は、MTK・Ⅱラツテ腹水肉腫細胞を上記の操作にて洗浄せるものを、内径5 mm、深さ2 mmの小ガラス皿に入れ、室温 ($25 \sim 30^\circ \text{C}$) にて照射した。照射には同じく10分を要した。従つて腹腔内より腫瘍細胞を取り出してから、測定までに更に10分を必要とする。対象実験において、採取後30分においても直ちに測定せるものと間に差は認められないので、照射の為の時間に特別な影響はない。

実験結果

ラツテ腹水肉腫であるMTK・Ⅱ腫瘍細胞の 25°C における等温水蒸気圧曲線は第10図の如くである。

活性度 0.8においては、乾物1 g当り 2.0 gの水を結合し、活性度の 0.7においては、1.02 g、活性度 0.6においては0.64 g、活性度 0.5においては0.40 gで、この範囲内においては活性度の低下に伴い結合水は急激に減少する。活性度 0.4においては0.30 g、活性度 0.2においては0.23 gで、この範囲においては水の減少は軽度である。生体内X線 $2 \times 10^3 \text{ r}$ 照射後においては、活性度 0.8においては1.80 g、活性度 0.6においては0.48 gで、急激に水の重量を減少し活性度 0.4においては0.38 g、活性度 0.2においては0.32 gで、平坦部を形成する。曲線は活性度 0.5附近で交叉し、それより小さい活性度においては、水の量は増加している。

生体外X線 $2 \times 10^3 \text{ r}$ 照射直後においては、乾物1 g当りに結合せる水の量は極めて多く活性度 0.7にては、乾物1 g当り結合せる水の量は1.96 g、活性度 0.6においては1.66 g、活性度 0.4にては1.02 g、活性度 0.2においては0.58 gで、曲線は直線的になり、非照射例に比し、いずれの活性度においても結合せる水の量は著しく大となっている。

等温水蒸気圧曲線につき多層吸着理論により解析を行うと、第3表の如く非照射例においては、

一層の結合水量は乾物1 gに対し0.22 g、二層までの結合水量は0.35 g、全結合水量 ($a \leq 0.7$) は1.02 gである。一層の結合水の結合エネルギーは 1.6 kcal/mol である。一層の結合水と二層までの結合水との比は 1.6である。

生体内X線 $2 \times 10^3 \text{ r}$ 照射においては一層の結合水量は乾物1 g当り0.24 g、二層までの結合水量は0.48 gとなり、非照射例に比しわずかに増加する。全結合水量は乾物1 g当り0.62 gで、非照射例に比し著しく減少している。一層の結合エネルギーは 1.4 kcal/mol である。一層の結合水量 (V_{m1}) と二層までの結合水量 (V_{m2}) との比は 2.0と変化している。

生体外X線 $2 \times 10^3 \text{ r}$ 照射の場合には、乾物1 gに対する一層の結合水量は 0.78 g、二層までの結合水量は0.89 g、全結合水量は1.96 gで、結合エネルギーは 1.1 kcal/mol となり極めて小となる。 V_{m2}/V_{m1} の値は 1.2となり極めて小さな値となつている。一層の結合水量は非照射例に比し 3.5倍の値を示し、生体内照射の場合に比し著明な変化が認められる。二層までの結合水量も増加するが、二層目の結合水は極めて少い。結合エネルギーも非照射例、生体内照射例に比し小となつている。

生体外照射の場合には、水の結合状態が極めて著明なる変化を受けている事が推察し得るが、その形については検討中である。

生体内及び生体外照射において極めて大きな差が見られるが、この原因も明らかでない。ラツテ腹水腫瘍細胞において、結合水はX線照射により変化し生体内では一層及び二層までの結合水の増加を見るがその程度は軽度である。生体外照射と生体内照射とは明らかに異なるが、その原因は明らかでない。

ラツテ赤血球についての実験

赤血球は⁵³⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、生体細胞の中で核がなく細胞としてよりも、生体内での代謝に参与するヘモグロビンの集塊とも考える事も出来る。

赤血球は数千レントゲンの照射でも、溶血現象が促進されることが観察されている⁴⁷⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾。そ

こで赤血球について同様に結合水の変化を検討した。

実験材料としてラット赤血球を用いた。Wistar系成熟ラットの尾端を切断し、流出する血液を生理食塩水を入れたスピッツグラス内に受け、これを遠沈し生理食塩水により3回洗浄をくりかえし、この沈渣を測定用小ガラス容器に入れ照射した。

X線照射は 0.5×10^3 r, 1×10^3 r 及び 2×10^3 r を前述の実験条件で照射した。照射には2.5分より10分を要した。照射による測定までの時間間隔による影響は、対象である非照射例においては見られなかった。

実験結果

ラット赤血球の25°Cにおける等温水蒸気圧曲線は第11図に示す如くである。測定を開始し測定回路内の排気を開始すると直ちに残存せる溶媒である生理食塩水の凍結を見る。実験の過程において脱水を行うと、直ちに活性度 0.7まで減少し、これ以上の活性度にては、確実なる測定点を得る事が出来なかつた。非照射例においては、活性度 0.7において乾物1g当り0.45g, 活性度 0.6において0.42g, 活性度 0.4において0.37g, 活性度 0.2においては0.33gで、活性度 0.7以下は明らかな平坦部を形成する。X線 0.5×10^3 r 照射例においては、活性度 0.6で乾物1g当り結合せる水の量は0.50g, 活性度 0.4では0.45g, 活性度 0.2では0.40gで非照射例と同じく活性度 0.7以下は平坦部を形成するが、結合する水の量はいずれも増加している。

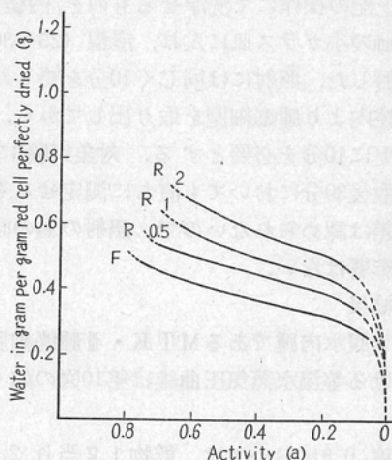
Fig. 11. Isothermic vapour pressure curve for rat red cell (25°C)

F: Non-irradiated red cell

R_{0.5}: After 0.5×10^3 r irradiation of red cell in vitro

R₁: After 1×10^3 r irradiation on red cell in vitro

R₂: After 2×10^3 r irradiation on red cell in vitro



X線 1×10^3 r 照射例においては、活性度 0.6では乾物1g当り結合せる水の量は0.57g, 活性度 0.4では0.50g, 活性度 0.2では0.44gで更に結合せる水の量は増加する。

X線 2×10^3 r 照射例においては、活性度 0.6では乾物1gに結合せる水の量は0.67g, 活性度 0.4では0.58g, 活性度 0.2では0.51gで、更に結合せる水の量は増加する。

多層吸着理論による解析では、第4表の如く非照射例では一層の結合水量 (V_{m1}) は0.25g, 二層までの結合水量 (V_{m2}) は0.45gである。X線

Table 4. Irradiation effects on the bound water for rat red cell

	Amount of water in gram bound per gram dried sample		(V_{m2}/V_{m1})	(E_1-E_0) (Kcal/mol)
	(V_{m1})	(V_{m2})		
Non-irradiated	0.25	0.45	1.8	3.0
After 0.5×10^3 r	0.31	0.53	1.7	2.9
After 1×10^3 r	0.34	0.60	1.8	2.8
After 2×10^3 r	0.38	0.67	1.8	2.8

生体外 $0.5 \times 10^3 \text{r}$ 照射例では、一層の結合水量は 0.31 g 、二層までの結合水量は 0.53 g でX線生体外 $1 \times 10^3 \text{r}$ 照射例ではそれぞれ V_{m1} は 0.34 g 、 V_{m2} は 0.60 g である。X線生体外 $2 \times 10^3 \text{r}$ 照射例では、一層の結合水量は 0.38 g 、二層までの結合水量は 0.67 g である。X線照射の線量の増加と共に一層の結合水量及び二層までの結合水量、ともに増加する。一層の結合水の結合エネルギーはいずれも約 3 kcal/mol で等しく、一層の結合水量に対する二層までの結合水量の比 (V_{m2}/V_{m1}) は約 1.8 で変化しない。赤血球においては照射により線量の増加に伴い結合水量の増加を来すが、水と赤血球の状態は変化しないと考えられる。

考 按

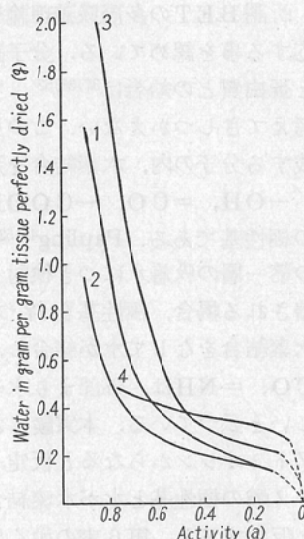
生体においては³²⁾³³⁾³⁴⁾、水が量的に最も重要な組成である事はよく知られているが、殊にその水の一部は結合水として生体の構成の一部となり、所謂自由水と生理的に差を有すると考えられている¹⁾³⁵⁾³⁹⁾⁴⁴⁾⁵³⁾。

Llogd 等 (1933) ³³⁾³⁵⁾⁵³⁾ は各種の蛋白質の結合水を研究し、生理的に活発な細胞に存在する蛋白質例えばザルミン、筋肉の蛋白質、コラーゲン等は殊に多量の結合水を有すると云っている。

本実験におけるラットの生体筋肉組織、肝臓組織、腫瘍細胞及び赤血球の結合水の状態は、第5表、第12図に見る如く、乾物 1 g 当りの一層の結合水量 (V_{m1}) は腫瘍細胞では 0.22 g 、筋肉組織は 0.19 g 、肝臓組織は 0.11 g で生物学的に活動度の異なる組織程、異なる結合水を持つている。D

Fig. 12. Isothermic vapour pressure curve for fresh tissues (25°C)

- 1: Rat muscle tissue
- 2: Rat liver tissue
- 3: Tumor cell (MTK III)
- 4: Rat red cell



NAの 0.20 g 、ザルミンの 0.11 g 、コラーゲンの 0.10 g 、血清アルブミンの 0.07 g に比較すると腫瘍細胞がDNAより大なる値を示している²⁹⁾⁵²⁾。赤血球の 0.25 g は最大なる値を有するが⁵³⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、この等温水蒸気圧曲線は他の組織及び物質と異った形を示し、全結合水量が二層までの結合水量である事も特異で、これは赤血球構造の特殊性によるものと思われる。

X線照射により筋肉組織、肝臓組織、腹水肉腫

Table 5. Irradiation effects on the bound water for various living tissues, protein (Salmin, Collagen, Serum albumin.) and DNA

	Amount of water in gram bound per gram dried sample			V_{m2}/V_{m1}	(E_1-E_0) (Kcal/mol)
	(V_{m1})	(V_{m2})	Total bound water at $a \leq 0.7$		
Muscle tissue	0.19	0.27	0.55	1.4	1.4
Liver tissue	0.11	0.23	0.35	2.0	2.0
Tumor cell	0.22	0.35	1.02	1.6	1.6
Red cell	0.25	0.45	0.45	1.8	3.0
Salmin	0.11 ⁵²⁾				
Collagen	0.10 ⁵²⁾				
Serum albumin	0.07 ⁵²⁾				
DNA	0.20 ²⁹⁾				

細胞及び赤血球のすべてにおいて $0.5 \times 10^3 \text{r} \sim 4 \times 10^3 \text{r}$ の照射によつて、一層の結合水量は増加しているがこの機序について以下考察する。

化学的な立場から結合水とは、吸着水に外ならないと考えて吸着理論の立場から研究し Bull 等は³⁵⁾⁴³⁾、所謂 B E T の多層吸着理論⁴³⁾が実験的結果に適応する事を認めている。分子論的立場から水分子と蛋白質との結合は³⁷⁾³⁸⁾⁵²⁾、主として水素結合と考えてさしつかえない。この見地から蛋白質を構成する分子の内、水素結合を形成し得る原子団は、 $-\text{OH}$ 、 $=\text{CO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $=\text{NH}$ 等の極性基である。Pauling⁴⁴⁾⁵²⁾ (1945) は蛋白質の第一層の吸着水につき検討し、蛋白質に水が吸着される場合、極性基を持ったアミノ酸側鎖に水素結合をなして水が結合し、ペプチド主鎖の $=\text{CO}$ 、 $=\text{NH}$ は、外部より水を吸着する能力に乏しいと云っている。本実験において筋肉組織がアクトミオシンからなると仮定して⁴⁵⁾、その組成アミノ酸の極性基と水が水素結合をもつて結合すると仮定すると、第6表の如くラッテ筋肉組織においては、乾物 10^5g 当り 3200mol となる。非照射の生体内筋肉組織の実測結合水量は 1050mol で、この値はペプチド主鎖は閉じ、アミノ酸側鎖の極性基に水がつくと仮定した 1500mol に近くなる。 $4 \times 10^3 \text{r}$ X線照射の場合は 2300mol となる。この値はペプチド主鎖の $=\text{CO}$ 、 $=\text{NH}$ にも水分子が結合し、側鎖にも水が結合せると仮定した値 2400mol に近い値を示している。同様の事

が、赤血球についても⁴⁶⁾、ヘモグロビンの集塊となると考えると新鮮赤血球においては蛋白質の場合と同じくペプチド主鎖は閉じ、アミノ酸側鎖のみに水がつくとした場合に等しく、X線照射の場合はペプチド主鎖の $=\text{CO}$ 、 $=\text{NH}$ にも水がつくとした値に近くなる。

X線照射の影響⁴⁴⁾は、数千レントゲンの照射においては、水素結合を形成し得る極性基の数はペプチド主鎖の $=\text{CO}$ 、 $=\text{NH}$ にも、水が結合し得る状態になったと考えて一応の説明をなし得る。

エネルギー論的に考えて照射例における結合水の増加が水素結合を形成し得る極性基の増加、あるいは遊離状態における極性基の増加と考えられる。もしペプチド主鎖の切断によつて、 $-\text{NH}_2$ 及び $-\text{COOH}$ の増加したと考えて見るとこの場合、実験における結合水の増加量より計算すると、必要な線量は与えた線量の 10^5 倍となる。従つてペプチド主鎖の切断は考えられない。

筋肉組織の場合、 $4 \times 10^3 \text{r}$ 照射による弾域の大きさは⁹⁾、アクトミオシン分子の大きさの 10^3 倍と計算されるので、此等分子がそれぞれ独立の分子であると考えても説明が困難である。可能な説明の一つはアクトミオシン分子が重合し、巨大分子を形成していると仮定し、この分子中に吸収されたエネルギーが、ペプチド主鎖同志間の S-S 結合等の結合を切断する場合である。

筋肉組織の照射においては、 $4 \times 10^3 \text{r}$ 照射によ

Table 6.

	Amount of water in mole bound per 10 ⁵ g dried sample	
	Rat-muscle tissue (As a mass of Actomyosin)	Rat red cell (As a mass of Haemoglobin)
When all of polar radical in the composed amino acid is bound with water	3200	2900
When both peptid main chain ($=\text{CO}$, $=\text{NH}$) and side chain of amino acid are bound with water	2400 (after $4 \times 10^3 \text{r}$) 2300	2100 (after $0.5 \times 10^3 \text{r}$ 1700) (after $1 \times 10^3 \text{r}$ 1900) (after $2 \times 10^3 \text{r}$ 2100)
When peptid main chain closed and side chain bound with water	1500 (on-irradiated 1050)	1300 (Non-irradiated 1400)

つて一層の結合水量は非照射例の0.19gより直後に0.41gと増加している。24時間後、48時間後には回復している。同様の変化が肝臓組織、腫瘍細胞にも見られる。この様な変化は照射直後に細胞内の水と結合する極性基の増加により結合水の増加を来し、種々なる形質に変化を来す事が推測される。照射直後に見られるミトコンドリアの膨化、細胞内網状構造(er)の著明な現出、核質及び仁の膨化等の変化はこの様な結合水の増加が一因と考えられる。しかもこの様な形態的变化が可逆的に速かに回復し、細胞機能もこれに伴い回復する事から考えて、照射による変化の一つが、細胞の物質代謝等により容易に修復し得る変化である事が考えられる。結合水の変化或はペプチド主鎖間のS-S結合等の修復は容易である事が、可逆的な速かな回復の一因と推察し得る。

赤血球における結合水の状態は⁵³⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、一層の結合水量は乾物1g当り0.25gで、二層までの結合水量は0.45gで、これが全結合水量になっている事は、赤血球においては二層以上の水がつき得ない事を示すもので、他の組織及び蛋白質等と大いに異っている。結合のエネルギーも3kcal/molと極めて強い事も特異である⁴⁰⁾。照射により結合水量は増加するが結合状態は変化しない。赤血球における $0.5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^3$ rの小線量で著しい結合水の増加は、結合水を取り得る極性基の増加を示している。照射による赤血球の膨化、溶血の促進等は⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾、照射による結合水の増加も大きな原因と考えられる。

結 論

生体組織結合水に対するX線照射の影響を蒸気圧法結合水測定法により検討し、次の結果を得た。

(1) 新鮮ラット筋肉組織に於て、乾物1g当り一層の結合水量(V_{m1})及び二層までの結合水量(V_{m2})はそれぞれ0.19g、0.27gである。全結合水量($a \leq 0.7$)は0.55gで、一層の結合水量(V_{m1})と二層までの結合水量(V_{m2})との比(V_{m2}/V_{m1})の値は1.4である。一層の結合水の結合エネルギー(E_1-E_0)は1.4kcal/molであ

る。

X線 4×10^3 r照射直後 V_{m1} は0.41gに増加し、照射24時間後、0.12gに軽度減少し、照射48時間後、非照射例と同様の値を示した。

(2) 新鮮ラット肝臓組織において V_{m1} 及び V_{m2} はそれぞれ0.11g、0.23gである。全結合水量($a \leq 0.7$)は0.35gで、 V_{m2}/V_{m1} の値は2.0である。 E_1-E_0 は1.4kcal/molである。

X線 2×10^3 r照射直後 V_{m1} は0.20gに増加した。

(3) 新鮮ラット腹水肉腫細胞において、 V_{m1} 及び V_{m2} はそれぞれ0.22g、0.35gである。全結合水量($a \leq 0.7$)は1.02gで、 V_{m2}/V_{m1} の値は1.6である。 E_1-E_0 は1.6kcal/molである。

生体内及び生体外X線 2×10^3 r照射により V_{m1} はそれぞれ0.24g、0.78gに増加した。

(4) 新鮮ラット赤血球において V_{m1} 及び V_{m2} はそれぞれ0.25g、0.45gで全結合水量($a \leq 0.7$)は0.45gで V_{m2}/V_{m1} の値は1.8である。 E_1-E_0 は3.0kcal/molである。

生体外X線 0.5×10^3 r、 1×10^3 r及び 2×10^3 r照射直後、 V_{m1} はそれぞれ0.31g、0.34g、0.38gと増加した。

(5) X線照射による結合水の増加は、水素結合を作り得る極性基増加による。エネルギー論的にペプチド主鎖間の結合の切断が原因であると推論される。

本論文の要旨は第13回日本医学放射線学会総会(東京)及び中国四国九州合同部会(山口)に於て発表した。

文 献

- 1) G.F.W. Wolstenholme, and G.M. O'Connor, ed: "Ionizing Radiations and Cell metabolism" Churchill, London (1956).
- 2) F. Ellinger, "Medical Radiation Biology". Thomas, Illinois (1957).
- 3) A. Hollaender, Radiation Biology. I, McGraw-Hill, N.Y. (1954).
- 4) F.G. Spear: Brit. J. Radiol., 24, 413 (1951).
- 5) C.B. Allsopp, Brit. J. Radiol., 24, 413 (1951).
- 6) 尾水伝六: 日医放誌, 19 (4), 819 (1959).
- 7) 森本裕嘉: 四国医誌, 16 (1), 390 (1960).
- 8) T.A. Okada, and F. Kawamura, J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool., 13 (1957).
- 9) D.E. Lea: "Actions of

Radiations on Living Cells". 2nd ed, Cambridge University Press. London(1955). —10) J. Weiss: Nature 153, 748(1944). —11) J. Weiss: Brit. J. Radiol. Suppl., 1, 56 (1947). —12) M. Wakabayashi, and F. Kawamura: Monogr. Res. Inst. Appl. Elec., 5, 91 (1955). —13) E.S.G. Barron: Ann. N.Y. Acad. Sci. 59, 574 (1955). —14) 江藤秀雄他: 放射線医学 (1959). —15) J. J. Nickson: "Symposium on Radiology, New York, (1952). —16) W.M. Dale: Biochem. J., 36, 80 (1942). —17) E.S.G. Barron, and S. Dickman: J.C. Physiol., 32, 595 (1949). —18) H.R. Muller "Advances in Radiobiology" Ist. Oliver and Boyd LTD., Edinburgh(1957). —19) S. Okada, and L. D. Peachey: J. Biophysic and Biochem. Cytol., 3, 239 (1957). —20) S. Okada, and E. Kallee, Exp. Cell Research, 11, 42 (1956). —21) S. Okada, and G.L. Fletcher: Radiation Research, 5, 588 (1956). —22) 堀啓二: 細胞化学シンポジウム, 9, 109 (1959). —23) 沼本肇: 四国医誌16, (1), 45 (1960). —24) 岩佐桂輔: 四国医誌, 16 (2), (1960). —25) Nemoth, Helc: Chem. Rev. 34, 157 (1944). —26) B.M. Dugyer: "Biological Effects of Radiation", New York (1936). —27) J. G. Heepen, etc: Strahlenther., 67, 130 (1940). —28) J.H. Clark: Am. J. Roent., 40, 501 (1938). —29) 赤津修二: 日医放誌, 13, 318 (1958). —30) G. Scholes, G. Stein, and J. Weiss: Nature 164, 709 (1949). —31) G. Scholes, and J. Weiss: Exp. Cell. Res. Suppl., 2, 219 (1952). —32) R.A. Gortner, "Outlines of Biochemistry", John Wi-

ey, N.Y., 2nd ed. (1938). —33) K. Hirota and F. Kawamura, Monograph. Res. Inst. Appl. Elec. Hokkaido Univ., 2, 11(1951). —34) R.A. Gortner, Ann. Rev. Biochem., 1, 21(1932). —35) H.B. Bull, J. Am. Chem. Soc., 66, 1499 (1944). —36) D.J. Lloyd and Phillips, Trans. Faraday Soc., 29, 132 (1933). —37) O.L. Sponsler, J.D. Bath and J.W. Ellis: J. Phys. Chem. Soc., 60, 309 (1938). —38) O.L. Sponsler, Bath and Ellis: J. Phys. Chem., 44, 996 (1940). —39) 河村, 広田: 科学, 21, 469 (1951). —40) 関集三: 化学と工業, 6, 219(1953). —41) 緒方章: 南江堂, 東京, 化学実験装作法上巻, 167 (1960). —42) 関根幸四郎: 東京, コロナ社, 物理実験法, 401 (1961). —43) S. Brunauer, P.H. Emmett and E. Teller: J. Am. Chem. Soc., 60, 309(1938). —44) L. Pauling: J. Am. Chem. Soc., 67, 555 (1945). —45) 熊谷洋: 医学書院, 東京, 筋化学, 73 (1959). —46) Hans Behrendt, 医歯薬出版, 赤血球の化学, 53 (1958). —47) H. Holthusen: Fortschr. Röntgenstr., 29, 777 (1922). —48) T.P. Ting: J. Cellul. a Comp. Physiol., 16, 197 (1940). —49) W. Kunzer: Klin. Wschr., 31, 715 (1951). —50) A.C. Elizabetts: Am. J. Physiol., 73, 431 (1953). —51) B. Lindemann: Fortschr. Röntgenstr., 75, 523 (1951). —52) 東健一: 蛋白質化学4巻, 共立出版, 東京, 127 (1954). —53) 黒田嘉一郎, 中西哲一, 坂東玲芳: 生化学, 27 (8), 532 (1955). —54) 坂東玲芳: 生化学, 27 (10), 620(1956). —55) 辻博己: 四国医誌, 14(4), (1959).