



Title	急性放射線障害に対するポリエンホスファチジルコリンの効果
Author(s)	森野, 靖雄; 山本, 剛禧; 水川, 帰一郎 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1976, 36(9), p. 835-840
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19764
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

急性放射線障害に対するポリエンホス ファチジルコリンの効果

岡山大学医学部放射線科（主任：山本道夫教授）

森野 靖雄 山本 剛禧 水川 帰一郎
青野 要 田辺 正忠 山本 道夫

（昭和50年12月25日受付）

（昭和51年4月19日最終原稿受付）

Radioprotective Effect of Phosphatidylcholine on Radiation Injury

Yasuo Morino, Goki Yamamoto, Kiichiro Mizukawa, Kaname Aono,

Masatada Tanabe and Michio Yamamoto

Department of Radiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

Research Code No.: 408

Key Words: Radioprotection, Essential phospholipid, Phosphatidylcholine

Polyene phosphatidylcholine with poly-unsaturated fatty acid (essential phospholipid, EPL) was given to mice irradiated 500 R on the whole body. The survival of the irradiated mice was extended by the administration of EPL before and after irradiation. The fatty acid composition of the liver mitochondria did not show any significant difference among EPL administered group, irradiated group (6 hrs after irradiation), and control group. The liver mitochondria were isolated 3 hrs after 1,000 R irradiation on the whole body, and the oxidative phosphorylation of mitochondria was assessed by an oxymeter. The oxidative phosphorylation ability diminished by irradiation was recovered when EPL was added to the medium.

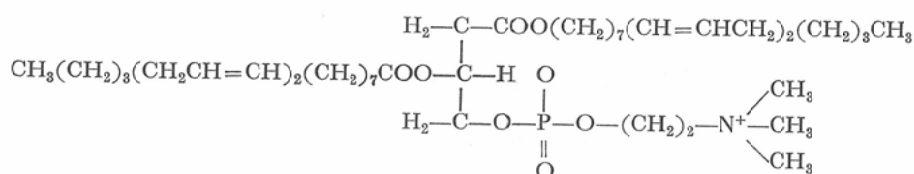
I 緒 言

最も最初に高級不飽和脂肪酸と放射線障害との関連に着目したのは、Decker と Mead⁶⁾ のようである。彼らによれば慢性あるいは急性の必須脂肪酸欠乏は放射線照射動物の死亡率を著明に増加させるという。これをさらに詳細に検討したのは、Cheng と Deuel⁸⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁹⁾ らで、適当な脂肪を含む飼料で飼育した動物は、無脂肪食で飼育した動物よりもはるかに放射線障害に耐えるということを確認している。そして脂肪中の必須脂肪酸が

防護効果の主要因子であることを明らかにしたが、作用機序については不明である。放射線障害の指標となる血色素量、白血球数などについては何ら改善が見られていない⁸⁾。

ポリエンホスファチジルコリン（以下EPL）は側鎖に高級不飽和脂肪酸を有するコリン磷脂質で構造式は次のページの様なものである。

磷脂質は生体膜の構成成分としてのみならず、代謝活性を有し機能面においても重要な役割をもつものとして、近年電子伝達系における研究がす



すんでいる¹⁶⁾.

本実験では放射線全身照射マウスにEPLを投与し、生存率の上昇の有無を検討した。また作用機序解明の一環として肝ミトコンドリアを分離し、脂肪酸分析および *in vitro* でエネルギー産生系の検討を行った。

II 実験方法

1. 生存率の検討

各群30匹のマウスを以下の4群に分けて生存率を検討。

- 1) 全身 500 R X線 1 回照射群。
- 2) 照射前毎日 7 日間腹腔内に 5 mg 投与。
- 3) 照射後 7 日間毎日 5 mg 投与。
- 4) 照射後 7 日間毎日 10 mg 投与。

同様の群で 650 R X線全身 1 回照射。

使用動物：

オリエンタル固型飼料MFを用いて一定期間飼育した dd 系健康雄性マウス、体重20 gを使用した。

EPL投与方法：

EPLは日本商事 K.K. より提供を受けた。白色粘稠な油脂状で窒素にてバイアル中に封入しフリーザー中に保存、使用時滅菌蒸留水を混じTaiyo Mixer S-5F でコロイド状とし、10mg/ml に調整したものを直ちにマウス腹腔内に投与した。対照群には生食 0.5ml を腹腔内に投与した。

照射方法：

東芝 KXC 18 型深部 X 線治療装置を使用。200 kVp, 25mA, フィルター 0.5mmAl+0.5mmCu, 78.0R/min, F.S.D 50cm で全身照射を行った。

2. 肝ミトコンドリアの脂質分析

以下の各群3匹について肝ミトコンドリア脂質の脂肪酸構成比を検討した。

- 1) 未処置群
- 2) 500 R 全身照射後 6 時間目。

3) 500 R 全身照射後 24 時間目。

4) EPL 5 mg 7 日間投与 非照射群。

5) EPL 5 mg 7 日間投与後 500 R 全身照射 6 時間目。

6) EPL 5 mg 7 日間投与後 500 R 全身照射 24 時間目。

肝ミトコンドリアの分離は、Hogeboom¹²⁾ の変法により、脂質は Folch ら⁸⁾ の方法で抽出し、脂肪酸分析は島津ガスクロマトグラフ GC-1B を使用した。

3. エネルギー産生系の検討

1,000 R 全身 1 回照射後 3 時間目に肝ミトコンドリアを分離し、コハク酸基質下の呼吸活性を Bioxygraph²²⁾ (給水化学 K.K.) を使用し、oxymeter 法によって測定した。酸化リン酸化能の指標である ADP/O 比、呼吸調節能 (respiratory control index) は Chance ら²⁾ の方法で求めた。EPL を 50~100 μg/ml *in vitro* で添加し、非照射対照と比較検討した。

III 結果

Fig. 1 の如く 500 R 全身 1 回照射では、照射の

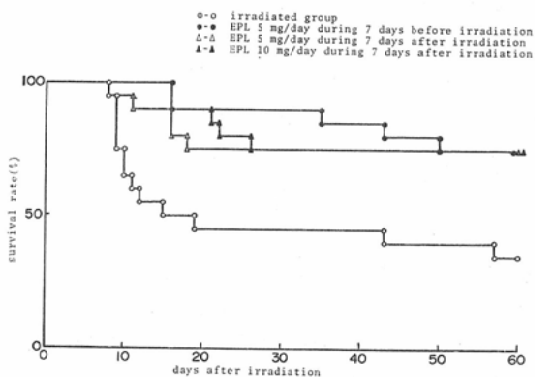


Fig. 1. Survival curves of mice after 500R of whole-body X-irradiation with the administration of EPL before and after irradiation

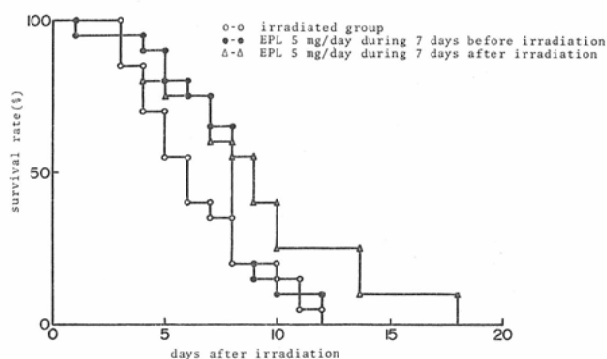


Fig. 2. Survival curves of mice after 650R of whole-body X-irradiation with the administration of EPL before and after irradiation

Table 1. Fatty acid composition of mouse liver mitochondrial lipid

groups	Composition of fatty acid (%)					
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:4}	C _{22:6}
Control	22.7	17.4	9.9	26.2	11.3	12.5
6 hrs after 500R exposure	24.2	14.9	10.4	25.4	10.9	14.2
24 hrs after 500R exposure	23.4	16.9	9.3	25.3	10.9	14.2
EPL administrated (5 mg/day for 7 days)	23.3	16.2	9.0	26.1	11.5	13.9
6 hrs after 500R exposure with the administration of EPL before irradiation	23.7	14.6	12.8	23.5	9.9	15.7
24 hrs after 500R exposure with the administration of EPL before irradiation	23.9	15.1	10.8	27.2	10.0	13.2

みの群は30日で9匹, 60日で7匹生存に対し, 照射前EPL 5mg 7日間投与群では30日で18匹, 60日で15匹生存. 照射後投与群では5mg, 10mgとも30日, 60日で15匹生存し, 照射前投与, 照射後投与とも明らかな生存率の上昇を認めた. 一方, 650R全身1回照射ではFig. 2の如く, 照射のみの群および照射前5mg投与群は12日目まで全例死亡, 照射後投与群は17日目まで2匹生存したが, 有意の差は認められなかった.

肝ミトコンドリアの脂肪酸分析の結果ではTable 1のように, コントロール群とEPL 5mg, 7日間投与群との間に有意の差は見られなかった. また500R全身照射後6時間後および24時間後と各群との間にも有意の差は見られなかった.

酸化的リン酸化能の検討ではFig. 3の如く, コ

ハク酸基質下で非照射対照のADP/O比は1.93, 呼吸調節能1.80に対し, 1,000R照射肝ミトコンドリアではADP/O比は1.53と低下を認めた. 呼吸調節能は1.79と変化を認めなかった. ここでEPLを添加すると照射群のADP/O比は, 1.98と対照と同程度の値まで回復が認められた. EPLの存在下では対照, 照射群ともstate 3の酸素消費は見かけ上抑制されると同時にADP添加後の呼吸調節能は上昇した.

IV 考 察

ホスファチジルコリンはその構成脂肪酸の種類によつて活性を異にし, 高度不飽和の脂肪酸を有するものほど生物学的活性が高いとされている. すなわちYamashita²⁵⁾によれば, 再構成された電子伝達系において高度不飽和の脂肪酸を有する

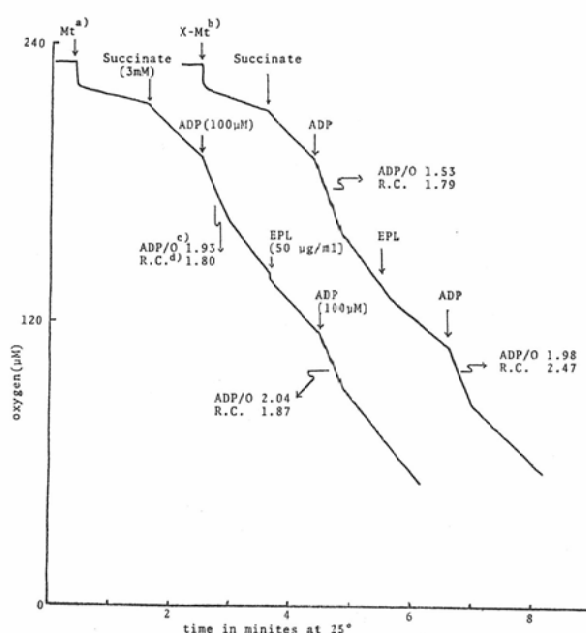


Fig. 3. Effect of EPL on the oxidative phosphorylation of liver mitochondria isolated from mice with 1,000R whole-body X-irradiation
 Medium: 0.15M sucrose, 0.02M KCl, 0.003M $MgSO_4$, 0.01M Tris-HCl (pH 7.4), 0.02M K-phosphate (pH 7.4)
 a) Non-irradiated (control) liver mitochondria
 b) Irradiated liver mitochondria
 c), d) ADP/O and R.C. (respiratory control) were calculated from oxygen electrode tracings²⁾

ホスファチジルコリンほど反応活性が高いとしている。Kagawa¹⁸⁾も同様の報告をしている。EPLは必須磷脂質 Essential Phospholipid を略した商品名で、polyenoic acid (リノール酸を約70%含有)を脂肪酸残基とする精製レシチンである。

放射線障害に対するEPLの効果を検討するため、500R全身1回照射マウスに照射前および照射後に連日7日間EPLを投与し、いずれも明らかな生存率の上昇を認めた。この実験結果で特に注目されるのは、照射後投与でも照射前投与と同様の効果が見られることで、EPLは防護のみならず回復作用をも有することが示唆される。必須不飽和脂肪酸ことにリノール酸が放射線障害に対する防護効果を有することはCheng, Deuel³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁹⁾らによつて詳細に検討されている。10mgから効果が認められ⁷⁾、報告者によつて差があるが最

適量は100mgにも達するであろうとされる⁴⁾。致死量の全身1回照射で生存率を延長させるのみならず、半致死量以下の線量を数回にわたつて照射する場合でも同様の障害防護効果が認められている⁸⁾。一方、高級不飽和脂肪酸でもリノレン酸はごく軽度の防護効果しか有していないが、リノール酸とともに投与するとリノール酸の作用を著明に増強させる様である⁹⁾。この関係は成長に対する実験でも認められている⁹⁾が作用機序については不明である。放射線障害の指標である血色素量、白血球数については何ら改善が見られない⁹⁾。EPLに関しては、Gregl¹⁰⁾の全身照射ラットについての報告が見られ、400R全身照射後連日4mg投与で約20%の生存率の上昇を認めたと報告している。2mg投与では効果を認めていない。Chengらの報告でも見られる如く、必須脂肪酸の

投与量は10mgよりも50mg, 50mgよりもさらに 100 mgの方が効果が大きく⁴⁾, 著者の実験結果では5 mgと10mg投与では特に有意の差は認められなかったがさらに大量投与も検討してみる価値があると思われる。

さて、分離された生体膜の分析結果からどの膜系もほぼ共通して主要な構成々分として蛋白質、脂質、糖を含み、脂質の主成分は磷脂質とコレステロールであることが知られている。ミトコンドリア膜の30%は脂質であり、その90%は磷脂質である¹⁶⁾。高級不飽和脂肪酸を残基とするEPLを連続投与した場合、肝ミトコンドリア脂質の脂肪酸構成比に変動が生じるか否かであるが、実験結果では非投与群との間の有意の差を認めなかった。Williamsら²⁴⁾は無脂肪食ラットとリノール酸投与ラットとの肝ミトコンドリア脂質の脂肪酸構成を調べ、不飽和脂肪酸比の著明な変化を報告している。著者の実験群は全て完全飼料であるため、特定の脂質投与でも変化が生じなかつたものかもしれないが、さらに長期投与について検討してみたい。放射線全身照射による肝ミトコンドリア脂質の脂肪酸比の変動であるが、内海、山本ら²³⁾は1,000 R全身照射のラットおよびマウスの肝ミトコンドリア脂質で高級不飽和脂肪酸の著明な減少をみている。一方、Schwarz¹⁹⁾は絶食ラットに1,000 R全身照射し、24時間後肝ミトコンドリア中の総脂質の増加と磷脂質量の相対的低下を報告し、磷脂質の脂肪酸構成比には有意の変化をみしていない。著者の実験結果でも照射群と非照射群との間に有意の差は認められなかつたが、照射線量および時間を変えて検討してみる必要がある。高級脂肪酸比が減少するとすれば、EPLはこれを補っている可能性も考えられる。

次にミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に対する放射線照射の影響についてであるが、肝ミトコンドリアについても多くの報告が見られる。Hall¹¹⁾らは840 R全身照射ラットで肝ミトコンドリアの数は最初の3時間減少しそれから回復するとし、P/O比は3時間後25%低下し12時間後まで持続、24時間から48時間でコントロール群の

値まで回復すると報告している。内海、山本ら²³⁾も全身照射ラット肝ミトコンドリアで酸化的リン酸化能は6時間後20%低下し、12時間から17時間で正常値に回復するとしている。Nitz-Litzowら¹⁴⁾も800 R全身照射後12時間でP/O比は30%低下すると報告している。Alexander¹⁾はさらに詳細に検討し、グルタミン酸、コハク酸、アスコルビン酸基質下で、3つの酸化的リン酸化部位のうち最後の部位が最も阻害され、72時間まで経時的に阻害は増大し72時間では100%阻害されるとしている。一方、Scaife¹⁷⁾¹⁸⁾らは肝ミトコンドリアにおける放射線照射の影響はごく軽度であるとのべ、Thomsonら²¹⁾も系統、年齢、性差の異なるラットで種々の実験条件下でも、1,000 R全身照射後4時間ではほとんど影響を認めていないなど否定的知見もある。著者の実験条件下では1,000 R全身照射後3時間目の肝ミトコンドリアで、コハク酸基質下に酸化的リン酸化能の低下を認めた。さらにin vitroでEPLを添加すると低下した酸化的リン酸化能が対照と同様の値まで回復するのが認められた。

磷脂質とミトコンドリアについては、谷口ら²⁰⁾は加齢により膨化したミトコンドリアは、ATPによる収縮能が失われるが、これにレシチンを加えると著しい回復が見られると報告している。小田ら¹⁵⁾はEPLの基礎的検討で、アセトン処理を行つたミトコンドリアでは呼吸機能が消失するが、これにEPLその他の磷脂質を電子伝達系に重要な役割をもつCoQとともに添加すると、呼吸機能の回復が見られ、回復率はEPLが他の磷脂質より最も高かつたと報告している。in vitroの結果をそのままin vivoの作用としては考え難いがエネルギー産生系の回復作用も作用機序の一因であろうと考える。

最後にEPLの生体内における薬理作用、臓器分布など解明されなければならない問題は多いが、放射線照射による脂質代謝の変動、脂質と生体膜およびこれにおよぼす放射線の作用などとも関連してEPLの放射線防護および回復効果は興味ある問題と思われる。

V 結 論

1) 高級不飽和脂肪酸を残基とするポリエノスファチジルコリン (EPL) を 500 R 全身照射マウスに投与し、照射前投与、照射後投与とも明らかな生存率の上昇を認めた。

2) 650 R 全身照射では有意の差を認めなかった。

3) 全身照射マウスより分離した肝ミトコンドリアの脂肪酸分析では、EPL 投与群、照射群、対照群で有意の差は見られなかった。

4) エネルギー産生系の検討の結果、*in vitro* で EPL は照射により低下した肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化能を回復させる作用を有することが示唆された。

本論文の要旨は、第34回日本医学放射線学会総会において発表した。

References

- Alexander, K.C., Aiyar, A.S. and Sreenivasan, A.: *Biochim. Biophys. Acta* 283 (1972), 206—216.
- Chance, B. and Williams, G.R.: *Nature* (London) 175 (1955), 1120—1121.
- Cheng, A.L.S., Kryder, G.D., Bergquist, L. and Deuel, H.J., Jr.: *J. Nutrition* 48 (1952), 161—182.
- Cheng, A.L.S., Ryan, M., Alfin-Slater, R.B. and Deuel, H.J., Jr.: *J. Nutrition* 52 (1954), 637—643.
- Cheng, A.L.S., Graham, T.M., Alfin-Slater, R.B. and Deuel, H.J., Jr.: *J. Nutrition* 55 (1955), 647—653.
- Decker, A.B. and Mead, J.F.: *U. S. Atomic Energy Project Report, U. C. L. A. No. 52* (1949).
- Deuel, H.J. Jr., Cheng, A.L.S., Kryder, G.D. and Bingemann, M.E.: *Science* 117 (1953), 254—255.
- Folch, P.J., Less, M. and Stanly, G.H.S.: *J. Biol. Chem.* 226 (1957), 497—509.
- Greenberg, S.M., Calbert, C.E., Savage, E.E. and Deuel, H.J., Jr.: *J. Nutrition* 41 (1950), 473—486.
- Gregl, A.: *Strahlentherapie* 46 (1960), 239—246.
- Hall, J.C., Goldstein, A.L. and Sonnenblick, B.P.: *J. Biol. Chem.* 238 (1963), 1137—1140.
- Hogeboom, G.H.: *Methods Enzymol.* 1 (1955), 16—19.
- Kagawa, Y., Kanprach, A. and Racker, E.: *J. Biol. Chem.* 248 (1973), 676—684.
- Nitz-Litzow, D. and Bührer, G.: *Strahlentherapie* 113 (1960), 201—206.
- 小田琢三, 小杜幸子, 有井裕子: *最新医学*, 24 (1969), 1573—1580.
- 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕髓: *ミトコンドリア (その分子構築と生化学)*, 南江堂, 東京 (1971).
- Scaife, J.F. and Alexander, P.: *Radiat. Res.* 15 (1961), 658—674.
- Scaife, J.F. and Hill, B.: *Can. J. Biochem. Physiol.* 40 (1962), 1025—1042.
- Schwarz, H.P., Dreisbach, L., Barrionuevo, M., Kleschick, A. and Kostyk, I.: *Arch. Biochem. Biophys.* 92 (1961), 133—139.
- 谷口己佐子, 中村元臣: *第20回酵素化学シンポジウム* (1969), 東京, 16—19.
- Thomson, J.F., Nance, S.L. and Bordner, L.F.: *Radiat. Res.* 29 (1966), 121—130.
- 内海耕髓, 小田琢三, 倉橋研吾, 宮原正信, 保田雅夫: *蛋白質核酸酵素*, 14 (1969), 621—624.
- 内海耕髓, 山本剛福, 山本道夫, 田辺正忠: *日本医学放射線学会誌*. 26 (1966), 345—350.
- Williams, M.A., Stancliff, R.C., Packer, L. and Keith, A.D.: *Biochim. Biophys. Acta* 267 (1972), 444—456.
- Yamashita, S. and Racker, E.: *J. Biol. Chem.* 244 (1969), 1220—1227.