



Title	放射線作用のCovering Effectに就て
Author(s)	安藤, 義男
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1955, 15(8), p. 737-746
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20009
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

放射線作用の Covering Effect に就て

昭和醫科大學放射線醫學教室(主任 氣賀正己教授)

講師 安 藤 義 男

(昭和30年7月8日受付)

目 次

1. 緒 論
2. 實驗方法
3. 結果及び考察
 - A). Alkylating Agents
 - B). Oxidizing Agents
 - C). Mercaptide Forming Agents
4. 總 括
5. 結 論
6. 文 獻

1. 緒 論

放射線の生物作用の研究は、その作用本態を極め放射線障害の豫防及び回復の方法を見出す事と、治療に得られた知識を應用する事を大きな目標としている。この目的を達成する爲には基礎的な生物作用機構の廣い研究は、忘却してはならぬと信じている。

而して、防禦作用 (Protection and Restoration) 並に増感作用 (Sensitization) の研究は、その結果が直接實地に應用され得る上に、生物作用機構の究明に役立つので、この兩様の意味から重視され、現在まで數多くの研究が爲されて居り、私も數年來酵母細胞アスペルギルス等の單細胞に就て、防禦作用及び増感作用の面から幾つかの實驗を行い、一部は既に報告している。¹⁾⁻¹⁰⁾

放射線の生物作用の初期のコースに就ては Risse¹¹⁾¹²⁾ Fricke¹³⁾ Weiss¹⁴⁾ Dale¹⁵⁾¹⁶⁾ 等に依つて研究され、それが間接的化學的作用に依る所が大である事が解明され、更に Barron 一派¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾ が廣範な生化學的研究からこの間接的化學的作用は放射線酸化作用 (Radio-oxidation) とも云うべきものであり、之に依つて反應性の非常に高い S

H基が先づ侵されるが、特に活性中心に S H基を持つている酵素 (SH-Enzymes) が重大な障害を被り易いと云つて居る。この S H學説の別な裏附けの一つとも云へるものに Patt²¹⁾²²⁾ Hollaender²³⁾ 等の Cysteine など S H物質の防護効果の究明があり、更に Bacq²⁴⁾ の Cysteamine の發見へと發展している。(尤も Barron²⁵⁾ も S H以外の反應活性基 NH₂, OH, COOH 等に對する障害も考へて居り、之に對しては S H物質以外に防護物質を探す事が必要であると云つて居る。我々も之に就ては同様意途のもとに實驗を行つて居る²⁾。

Barron の云う S H酵素の細胞内の所在をみると過半はミトコンドリアを中心に集約して居る。²⁶⁾²⁷⁾²⁹⁾ この Mitochondria の化學的活性が T.C.A. cycle, 呼吸系, A.T.P. 系が共軛してすさまじい事が私には興味深く、更に最近こゝで行われる酸化付着作用 (Oxidative Phosphorylation) に對する放射線の障害が研究されて特に van Bekkum²⁹⁾ 及びその一派³⁰⁾ Devik³¹⁾ 等に依ると Oxidative Phosphorylation の障害が核に及ぼす障害と同様に重大であろうと想像している事などから、先に報告せる如く Malonic acid⁴⁾⁸⁾ Urethan⁸⁾ 等の結果として Oxidative Phosphorylation を障害するものと、X線の併用効果を研究し、之等障害劑と放射線の併用に關する Working Hypothesis⁴⁾¹⁰⁾ を立てたのであるが、こゝに特に S H基を廣く障害すると共に Oxidative Phosphorylation の障害劑としても作用する Alkylating Agents (アレルギー化物質) Oxidizing Agents (酸化劑) Mercaptide Forming Agents (メルカプチド形成劑) を選び、之等の放射線と似た阻害點を廣く持つ障害劑と X線の併用効果に就て

實驗を行い、私の云う“Covering Effect”を得たので之を報告するものである。かゝる物質の一二に就て之と放射線の併用効果に就ては Carbtrees Bacq 他³²⁾が動物で増感作用を得る事に失敗しているが、その作用機構に就ての考察には動物では複雑なので單細胞生物を選んだものである。

2. 實驗方法

實驗材料は酵母細胞 (*Saccharomyces ellipsoideus*) である。pH 7.0 の Nägeli 液中に30°Cで數代培養し、次の試験管に移して4日目頃で醗酵増殖の最良な時期にビベットで強く振盪攪拌して酵母細胞を各個バラバラにする。(この時期だと殆んど分離する)。これを 0.1ccとり、別のpH 7.0 の Nägeli 液 1.0ccを入れた試験管に管壁に附かぬ様に入れて、約40分間30°Cに保存して後X線照射する。この最後の試験管に入れる前に各阻害剤を各濃度になる様に入れてpH 7.0とする。照射終了後直ちにpH 7.0 の Nägeli 寒天培地にバラバラに撒き、酵母細胞の移動を防ぐ爲に餘分のNägeli 液を吸い取る。

培養は30°C 20時間を普通とする。この間最初と、數時間後及び最後に顯微鏡で細胞の位置及び發育狀態を調べ、更に判定時まで同一細胞を追へる様に顯微鏡寫眞を撮つておく、これに依つて、放射線又は藥物に依る細胞分裂の遅れ (Delayed Division) の見落しが防げる。

回復過程に及ばず投與阻害剤の影響をみる時は Nägeli 寒天培地に各物質を各濃度になる様に入れておき (pH 7.0に補正) 無處置で照射した酵母を撒く。

生死の判定は、培養直後のまゝバラバラの細胞及びその膨化したもの、2細胞までで止つていものを死とし、2細胞1出芽細胞の形からコロニーを作つたものを生細胞とする。

1實驗に就ては 500個づゝ 8群~16群合計4000~8000個に就て生存率を算出した。

各實驗の都度無處置非照射對照の發育率を調べ各濃度の阻害剤投與の非照射對照のそれを前者を 100%として補正した。尚 20000 γ 照射の對照も、その都度とつて生存率をみた。

照射條件：培地の組成、使用した阻害剤の種類は次の如くである。

1. 照射條件

室温60KV, 3MA. non Filter, F.D 4.5cm
1000r/min 20000 γ (20min)

2. Nägeli 培地の組成

葡萄糖	10.0 g
酒石酸アンモニウム	1.0 g
第二磷酸カリウム	0.1 g
鹽化カルシウム	0.01 g
硫酸マグネシヤ	0.02 g
蒸溜水	100cc

この組成だと麥芽エキスなどの如き不確定なものでなく、本實驗の如きには最適と思うので之を採用した。尙寒天は2%である。

3. 阻害剤

A. Alkylating Agents

monoiodoacetic acid モノヨード醋酸
(Nitoromin) (ナイトロミン)

B. Oxidizing Agents

Alloxan アロキサン
Cystine チスチン

C. Nercaptide forming Agents

HgCl₂ 昇汞
(CoCl₂ 鹽化コバルト)

3. 結果及び考察

A. Alkylating Agents :

a). Monoiodoacetic acid.

(i) 結果

豫備實驗でヨード醋酸に1時間入れた時の發育阻害度は對照に比して10⁻²Mで15%, 10⁻³Mで6%, 10⁻⁴Mで0%であつた。故に實驗には10⁻³, 10⁻⁴Mを用いた。X線との併用の結果は表1に示す如くである。

一般には阻害剤と放射線の併用に於て、阻害剤自身では致死的な影響の無い濃度であつても、放射線作用と協力して當然致死効果が増加する事が期待されるが、逆に致死効果が減少している。この10⁻⁴Mの場合の生存率52.7%は對照と5%の危険率で推計學的に有意の差があつた。

Tale 1. Effect of Monoiodoacetic acid Combined with X-irradiation. on Yeast Cells (20,000r)

Subst. and its Concentration.	Surviv. %	
	appl. one hour before irradiation.	appl. soon after irradiation.
Mono-Iodoacetic acid $10^{-3}M$	48.7 ± 0.5	50.6 ± 0.2
" $10^{-4}M$	52.7 ± 2.2	—
Control	47.9 ± 2.4	

Tab. 2. Restoration by Application of some SH. Agents and Amino acids. (20,000r; 20h)

Subst. and its Concent. which appl. one hour before irradiation	Subst. and its Concent. which appl. soon after irradiation	Surviv. %
Mono-Iodoacetic acid $10^{-3}M$	Lysine $10^{-4}M$	60.0 ± 2.6
"	Cysteine $10^{-3}M$	70.4 ± 3.1
"	Glutathion $10^{-3}M$	48.0 ± 2.7
"	Glutamic acid $10^{-4}M$	61.1 ± 2.3
"	α -Ketoglutaric acid $10^{-3}M$	48.1 ± 1.7
"	Glycine $10^{-4}M$	53.0 ± 1.1

Tab. 3. Protection and Restoration by SH substances and Other Amino acids. on yeast cells (20,000r)

Substrates and their concentrations	Survivor %	
	appl. one hour before irradiation.	appl. soon after irradiation.
Cysteine $10^{-3}M$	59.1 ± 2.5	65.5 ± 3.1
Cystine $5 \times 10^{-5}M$	64.8 ± 1.2	67.3 ± 1.8
Glutathion $10^{-3}M$	60.3 ± 2.4	73.9 ± 0.8
Lysine $10^{-3}M$	—	57.4 ± 1.1
" $10^{-4}M$	55.1 ± 0.7	62.4 ± 7.1
Glutamic acid $10^{-3}M$	59.6 ± 2.6	65.3 ± 2.3
" $10^{-5}M$	61.7 ± 1.1	67.0 ± 7.0
α -Keto glutaric acid $10^{-3}M$	69.7 ± 1.1	61.7 ± 3.8
Glycine $10^{-3}M$	47.1 ± 2.1	53.3 ± 1.6
" $10^{-5}M$	55.8 ± 3.1	60.5 ± 2.8
Control	47.9 ± 2.4	

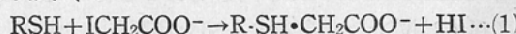
次に回復の過程に Cysteine; Glutathion, Lysine, Glutamic acid, α -Ketoglutaric acid, Glycine等を入れ、之等に依る回復効果を期待した。この處置に依る結果を表2に示す。

尚之等物質のみの場合の回復効果は表3に示す。

即ち Glutathion; α -Ketoglutaric acid, Glycineには全く回復効果なく、Lysine, Cysteine, Glutamic acidには回復効果があった。しかし、この中でも Cysteine に依る回復は特に大であり、Glutamic acidのはれそ対照(表3)に及ばない。

(ii) 考 察

ヨード醋酸のSH基に対する侵襲力に就ては現在では單にSH基のみに特異性が高いものではないと云われている。即ち Friedmann 他³³⁾に依れば次式(1)



で與へられる縮合反應は相當速いが一部のSH基としか反應しないと云う。平出³⁴⁾に依ると、ヨード醋酸は表在性SH基、溶在性SH基と反應すると云い、同時にBarron & Singer³⁵⁾はコハク酸脱水素酵素にP.C.M.B. (p-Chloromercuribenzoate)を加へて完全にSH基を阻害した後、ヨード醋酸を加へてから再びG-SHで阻害を戻すときは、13%しか戻らぬが、之を加へぬ時はG-SHで84%戻し得る事から、SH基以外にNH₂基等の阻害が起り、之が戻し得ぬものであるとしている。又平出³⁴⁾のコハク酸脱水素酵素系に於て、ヨード醋酸はこの酵等自身よりも、酸化的附燐酸作用の方の阻害が大である云う結果等々。SH基への特異性は疑問があるが、たゞ充分低濃度の場合($10^{-3}M$ 以下)はやはり溶在性表在性のSH基例へばコハク酸脱水素酵素、燐グリセロールデヒド脱水素酵素等の活性基などの阻害が特異的に起ると云う。³⁴⁾又この場合、阻害剤の作用する時間に就ても同様の事が云へよう。

私の使つた $10^{-4}M$ 作用時間1時間では防護作用を得たが、これが殆んどSH基に対する“Covering Effect”であるかどうかは次の(表3)回復過程に種々の物質を投與した私の Screening test (未發表)で知り得る。

即ちチステイン $10^{-3}M$ を入れて70%と云う對照に勝る生存率を得た事、及びリチンで60%であつた事からもやはりSH基阻害の方が大である事が

知れる。故にヨード醋酸の作用は細胞内で放射線に依り障害され易い、SH基を持つ酵素等と反応し、それに放射の作用を及び難くし、次で再賦活されて回復すると云う機構即ち“Covering Effect”が防護作用の本態であろう。

チステインと同じSH基を持つグルタチオンでは全く回復効果の無い事は Barron³⁵⁾ のコハク酸脱水素酵素の場合に似ている。この場合我々の云う如く³⁶⁾同じSH物質でもチステインの作用は殆ど Competition であるが、G-SHの方はそれよりも寧ろ之を中心とした生合成などの方面に重要な作用を有するものでヨード醋酸の障害に對する Competition には不向きであると考へている。(詳しくは間もなく發表する³⁶⁾を参照されたい)。

リザンの効果に就ては之の Ionic yield = 4.9 と云うSH物質に勝るものであるが、³⁷⁾防護作用の低い事は(表3)先に云へる如く放射線ではSH基障害の方が大である事を思ひしめる一つであるが、最近 Alexander³³⁾は Alkylating Agents の蛋白質への侵襲はその NH₂ 基、特にリザンの NH₂ 残基に特異的且高度に及ぶとして居り、先の Barron³⁵⁾の知見や、更に Spoerl 他³⁵⁾の酵母で2万γ照射後リザンが133%に増加するという報告等からリザンの Partially turnover への利用を含めて回復効果を期待したものであるが、單獨では60%の生存率を得たのみである。しかし我々の研究では³⁶⁾SH基で戻し得ぬところを回復せしめている結果も得られて居り、その防護作用の内容は異なると思われる。

グルタミン酸の回復効果は、對照にやゝ劣つたが、之が單に T.C.A. Cycle を經て分解系へ入る事に依るものではない事はα-ケトグルタル酸の無効な事からも一部知り得よう。

以上で知れる様にヨード醋酸の作用は、一定濃度で廣くSH基に働いて放射線作用がこゝに及び難い様に不活性化して、後に可逆的に再賦活され、回復して防護効果を現わすものである。

かゝる作用機構を私は“Covering Effect”と呼んでいるものである。

b). Nitromin

(i) 結果及考察

Nitromin に就ては既に一部を報告しているが之とX線の併用に依り、豫期した増感作用を得られなかつた事が、放射線に類似の作用を持つ Alkylating Agentsが反應活性の高いSH基を Cover して、放射線の障害のそこに及ぼす事を防ぐという作用機構ではないかと考へるに到つたものである。

Nitromin の $5 \times 10^{-2}\%$ では非照射對照の發育は無處置非照射對照に比べ84.2%, $5 \times 10^{-3}\%$ では92.8%, $5 \times 10^{-4}\%$ 以下では100%であつた。これ等濃度に依る結果は表4に示す。

Tab 4. Effect of Nitromin Combined with X-irrad. on yeast cells (20.000r)

Substrate and its Concentration	Survivors %	
	appl one hour ber-fore irradi.	appl. soon after irr-ad.
Nitromin $5 \times 10^{-2}\%$	57.9±3.8	43.0±2.6
" $5 \times 10^{-3}\%$	53.3±2.2	46.1±1.7
" $5 \times 10^{-4}\%$	54.6±1.1	48.4±1.8
" $5 \times 10^{-6}\%$	57.6±1.8	—
Control	47.9±2.4	

之等の生存率は5%の危険率で推計學的に對照と有意の差がある。この中 $5 \times 10^{-2}\%$ と $5 \times 10^{-6}\%$ とで58%の生存率が得られた事が重要である。即ち $5 \times 10^{-2}\%$ では阻害が相當大きく、SH基以外にも及ぶものであり、 $5 \times 10^{-6}\%$ でのそれは放射線作用に依り基質など Competitive factor の減少から阻害が大となると云う私の説の一つの證明でもあるが、この様な低濃度の場合に丁度 Cover が至適となるのであり、防護効果が大きくなるのである。この二つの結果は單に阻害剤が細胞の活性を全體として低下せしめて放射線の障害を減少せしめるのみではない事を示している。而して動物の場合にこの Covering Effect を得る爲にはこの濃度の問題のみでなく、その阻害作用が可逆的に容易に戻り得る事が必要で、この爲には Cover を取る手段が特に必要であろう。

Nitromin の侵襲する所は Cori 他⁴⁰⁾ Alexander⁴¹⁾に依るとSH基と一次的に結びついて、すぐ NH₂OH 基等と強く結合し、この方がこの

もの、作用の主要部分であると云う。事実 Barron 他⁴²⁾に依ると SH 酵素の中で、之に依り阻害を確實に受けるものは Choline Oxidase; Acetylcholine esterase; Choline acetylase; Pyruvic oxidase 等であり、この中前三者に對する作用は構造の類似性から拮抗的な阻害であらうとしている。このものの 10^{-4} M 位の濃度の阻害がこれら酵素系及び NH_2 基等の活性基に及ぶとしても、その防護作用機構の説明に困難ではないが、たゞ阻害の時間と可逆的に戻し得るもの、存在が問題である。

回復過程にそれでは何が有効かを知る爲に表 5 に示す如く、Cysteine, Hypon 其他、前と同様の物質を入れてみた。

Tab. 5 Restorability of SH-substances, some Amino acids and others by appl. of soon after irradiation.

Subst. and its concentration which appl. one hour before irradiation.	Subst. and its Concentration which appl. soon after irradiation.	Survivor %
Nitromin $5 \times 10^{-3}\%$	Cysteine 10^{-3} M	0
"	" 10^{-4} M	39.2 ± 1.9
"	Hypon 0.5% (Thiosulfuric acid)	45.3 ± 2.6
"	" 0.05%	46.0 ± 2.1
Nitromin $5 \times 10^{-4}\%$	Cysteine 10^{-3} M	41.7 ± 2.8
"	" 10^{-4} M	45.3 ± 1.7
"	Hypon 0.5%	45.4 ± 2.8
"	" 0.05%	43.1 ± 2.5
Nitromin $5 \times 10^{-3}\%$	Glutamic a. 10^{-4} M	65.7 ± 2.3
"	α -Ketoglutaric a. 10^{-2} M	60.7 ± 2.7
"	Glycine 10^{-4} M	61.4 ± 1.6
"	Lysine 10^{-5} M	64.4 ± 1.5
Nitromin $5 \times 10^{-2}\%$	Cystine 4×10^{-5} M	36.5 ± 2.7
" $5 \times 10^{-2}\%$	anoxia 20h	52.0 ± 2.0
Nitromin $5 \times 10^{-2}\%$	anoxia	60.1 ± 1.3
Control	anoxia 20h	50.2 ± 1.7

これでみられる如くチスチン、ハイボンで逆に増感作用を示した。このチスチン等の増感作用はその過剰に依り低酸素状態が起る爲でない事

は低酸素状態の実験で得られた結果から知れよう。この SH 物質の回復過程への悪影響と次のリチンに依る回復効果の大である事から Nitromin の作用點への疑問は益々深められようが、之に就ては更に研究中である。この様に $10^{-2} \sim 10^{-4}\%$ であつた Cover ではなく、その可逆性が SH 基で得られぬ様な反應としても SH 物質に依る増感作用はない筈である。

しかし $5 \times 10^{-6}\%$ と云う低濃度の場合にはヨード醋酸の低濃度の場合と同様 SH 基のみとの反應に依る Covering Effect としてよいであろう。

リチンの回復効果に就ては先に述べたが、この他にグルタミン酸、グリシン α -ケトグルタル酸でも回復効果がみられた。この事はその作用がヨード醋酸とは細い所では相違がある事がみられて興味深い。

尚 Cystine 5×10^{-5} M ではこの場合、之がチスチンと同様 SH 物質として増感作用を現していると考えられる。

以上述べた所から見ると、ナイトロミンに關しては SH 基に特異的阻害を得るには遙かに低濃度が用いられるべきで高濃度 (10^{-5} M 以上) ではむしろ NH_2 基等が侵され SH 基で戻し得ない。

しかしかかる場合にも一般的廣範な阻害剤として更に間接的に Oxidative Phosphorylation の阻害を惹起し、私の Hypothesis に云う如く、防護効果を示すものである。之に就ては又後に觸れたい。

B. Oxidizing Agents :

a). Alloxan :

(i) 結果 :

アロキサンは $10^{-3}\%$ で非照射對照の發育率は 1 時間之を作用させると 93%, 20 時間で 87.7%, $10^{-5}\%$ では 1 時間で 96%, 20 時間で 92% であつた。X 線を併用すると表 6 の如くなつた。

即ち $10^{-3}\%$ では對照と有意の差がなく、 $10^{-5}\%$ では對照と 5% の危険率で推計學的に有意の差がみられた。回復過程に Alloxan アロキサンを入れるとやゝ生存率が落ちた。

(ii) 考察

アロキサンは容易に糖尿病を起すので、その方

Table 6. Combined Effect of Alloxan with X-irradiation on Yeast cells (20,000r)

Substrate and its Concentration	Survivor %	
	appl. one hour before irradiation	appl. soon after irradiation
Alloxan $10^{-3}\%$	50.0 ± 2.2	44.7 ± 0.3
Alloxan $10^{-5}\%$	52.4 ± 2.9	44.7 ± 2.7
Cystine $5 \times 10^{-5}M$	64.8 ± 1.2	67.3 ± 1.8
Control	47.9 ± 2.4	

面に使われるが、SH基に対する酸化剤としての特異性及び可逆性は Griffiths⁴³⁾ の Hexokinase を、之で阻害し G-SHで戻し得る事の証明、Hopkins⁴⁴⁾ のコハク酸脱水素酵素の阻害及びそのG-SHで完全に戻し得た報告、更に Patterson⁴⁵⁾ のアロキサンがチスチンに依り可逆的に還元されてチアール酸となると云う報告等々に依り明かである。平出³⁴⁾に依ると Alloxan は溶在性SH基：表在性SH基及び深在性SH基（即ち多くのSH酵素の活性の中心をなすSH基）の一部其他に廣く阻害作用を有すると云う。但し之も濃度が高いと NH_2 基、OH基等の反応基に影響が生ずるが低濃度だと、SH基に特異的且可逆的に侵襲が行われると云う。尚平出に依れば Alloxanはコハク酸脱水素酵素系で Oxidative phosphorylation の中の Phosphorylation の方が特に侵されると云っている。³⁴⁾

以上の如き多くの所見から先づ Alloxan を低濃度で1時間與へた場合は放射線の作用が及び難い様に廣くSH基と反應してしまい後に可逆的に阻害が取れて回復するという Covering Effect を有すると考へられる。放射線の作用に依り、基質等之に Compete するものが減少して、阻害が大となり、Oxidative phosphorylation の阻害が強化されたとしても私の云う如き⁴⁾¹⁰⁾ 防護効果がみられるものであるが、たゞ若しコハク酸脱水素酵素の阻害が特に他の廣範な阻害作用より優れて強いと既に私共の報告せる如く⁴⁾⁵⁾⁸⁾ 防護効果はなくなり、甚しくこの阻害が大であれば逆に増感作用を得るものであろう。

このコハク酸脱水素酵素に就ては最近岡⁴⁶⁾は特にこれが分裂に關係深いと云うが我々の T. C. A Cycle の基質に依る防護作用の研究では⁵⁾ この酵素の基質コハク酸の効果が全くない。更に我々のマロン酸とX線の併用に依り増感作用を得た事など⁸⁾ この酵素の特異性が考へられるがとも角 Alloxan $10^{-3}\%$ で防護効果のみられない事は濃度に依つてはこの酵素の阻害の大きさが、他のSH基に比べ特に強いのではないかと考へて之を検討している。

b). Cystine

チスチンは酸化剤としてSH基阻害の特異性が最も高く、他の何れの基をも侵す恐れはないがたゞ水に難溶である爲に充分量の使へぬ事が問題である事と、之が還元されてSHとして働くもので Cover として作用するのではないとも考へられる。しかし酵母では表6にみられる如く $5 \times 10^{-5}M$ で防護作用も回復作用も30~40%認められた。

小 括

以上酸化剤のSH基に対する特異的可逆的阻害に依り、やはり放射線の作用から之等SH基を護り後可逆的に回復して生存率を高めると云う Covering Effect が得られた。

阻害剤の濃度に依つては前に述べた如く、それ自身阻害のない濃度でも放射線の併用に依り基質の減少を来すなど拮抗が阻害剤の方に有利になるので、至適の濃度としては Cover としては充分で、可逆的にかかる場合にも戻り得るぎりぎりの濃度である事が大事である。更にも一つは Alloxan の項でふれた様にコハク酸脱水素酵素系などの單一反應系への阻害が特に他の一般的阻害に比べて優れて強いと防護効果が上らないのではないかと考へている。

C. Mercaptide Forming Agents:

a) $HgCl_2$; ($CoCl_2$)

結 果

$HgCl_2$ の $10^{-4}\%$ で發育阻害は 7.5%, $10^{-6}\%$ では殆ど阻害なく $10^{-7}\%$ も同様であつた。この各濃度に依る2万r照射の生存率は表7の如くである。 $CoCl_2$ は $10^{-5}\%$ で發育阻害がない。

Tab. 7. Combined Effect of Hg-Cl₂ and Co-Cl₂ with X-irradiation (20,000r)

Substrate and its Concentration	Survivor %	
	appl. one hour before irradi.	appl. soon after irradi.
HgCl ₂ 10 ⁻⁴ %	52.0±2.5	55.3±4.4
HgCl ₂ 10 ⁻⁶ %	53.0±2.1	—
HgCl ₂ 10 ⁻⁷ %	52.2±1.7	—
CoCl ₂ 10 ⁻⁵ %	55.1±1.6	66.4±1.5

Tab. 8. Restoration by Application of some Amino acids soon after irradiation

Subst and its Concent. which appl. one hour before irradi	Subst. and its Concent. which appl. soon after irradi	Surviv %
HgCl ₂ 10 ⁻⁴ %	Glycine 10 ⁻⁴ M	56.2±1.4
"	Cysteine 10 ⁻³ M	62.2±2.1
"	Lysine 10 ⁻³ M	59.1±2.0
"	Glutamic acid 10 ⁻³ M	57.2±2.4
"	α-Ketoglutaric acid 10 ⁻³ M	50.3±0.3

これに依ると10⁻⁴%~10⁻⁷%で防護効果がみられた。照射後投與でも10⁻⁴%で55%の生存率であった。尚 CoCl₂ は防護効果より、回復効果に優れている。

例の如く回復過程にSH物質アミノ酸其他を與へると表8に見られる如く α-Ketoglutaric acid に回復効果がみられない他 glutamic acid の回復効果が對照(表3)より劣っている事等がみられた。チステイン、リチンは對照に近い生存率を得た。

考 察

Hg⁺⁺ のSH基に対する特異的侵襲は表在性のもののみならず、深在性SH基にもよく到達しその可逆性もアルキル化物質のそれに比して遙かに優れている。但し高濃度の場合はやはり蛋白質のNH₂基、OH、COOH基等との結合も生ずると云う。²⁴⁾

かくの如く低濃度の場合にSH基阻害の特異性

の大きいものであるので、之に依りCovering Effectを得る事を期待して10⁻⁴%~10⁻⁷%で防護効果を得たものでこの濃度で得た生存率は對照と有意の差があつた。

回復過程にチステイン、リチンを入れると回復が對照と同程度となる事からもHg⁺⁺の作用機序がSH基のCoverに依る事が知れるが勿論之がProtectorとして使用し得ると云うものではない。

CoCl₂に就ては之が觸媒としての作用が大であり、又實地上之が酸素の存在下では可逆的阻害劑としては作用しないと云う。³⁴⁾しかし特異的にSH基を侵す作用もその防禦効果の中には與つてゐるのは間違いないと考へているが、之をHg⁺⁺と同列にSH基に対するメルカプチッド形成劑として論ずるのは當を得ないと思うので差控えたい。(文献(6)参照)

小 括

優秀なるメルカプチッド形成劑であるP.C.M.β. (p-Chlomercuric benzoate)を驅使してのBarron他¹⁹⁾のUreaseの實驗と同様にSH基をHg⁺⁺で先にCoverしておくで放射線の致死効果を酵母に於ても減少せしめ得る事を知つた。

勿論in Vitroの實驗と複雑な細胞のしかも複雑な生死をCriteriaとする實驗を同一に論ずべきではないかも知れないが、その阻害がSH基に特異的且可逆的である様選擇された阻害劑の一定の濃度では私の云うCovering Effectと云う作用機構が最も大きな防護機構であろうと考へている。

4. 總 括

以上の如くアルキル化物質、酸化劑、メルカプチッド形成劑等の特に細胞内SH基に特に特異性が強いと云われる阻害劑を用いて、放射線の酸化作用の及ぶと考へられる、之等化學的活性の高いSH基を侵襲阻害せしめてから、X線照射を行った場合は當然障害が増加する即ち之等阻害劑がX線の作用と協力すると考へられるが實際は逆に防護効果を得た。之は阻害劑に依り、廣く反應基が不活性化され、X線の作用が之に及び難くなり、且この阻害が可逆的に回復して防護効果を得

るものであり、此の作用機構を私は Covering Effect と呼んでいる。

之等の結果は特に放射線治療に関連して重要であると考へている。たゞ放射線感受性の高低、作用時間、排泄の問題及び阻害剤に対する臓器特異性等々複雑な條件が入る動物に於てその生死に關して同一結果を得るとは考へていない。

ヨード醋酸でもアロキサン、 Hg^{++} にしても、高濃度の場合は NH_2OH , $COOH$ 基等SH基以外にも阻害が及ぶが、私の Screening Test に依ると、SH基に対する Competition を最大の作用とする。チステインが最も有効な回復剤であつた事から、先づ第一にSH基の阻害が最大であり、次で NH_2 基阻害もリチンで回復せしめ得たが、之に就てはリチンに依る回復はSH物質に依つて防禦され得るところと別個なものである事も知れている。

かくの如く Covering Effect を得るには、SH基に特異的且可逆的な阻害でなければならないが、若しX線の障害を餘り受け難い反應系、ひいては酸化的附磷酸作用の阻害であつても、我々のウレタン、 $KCN^{7)}$ 又は Bacq の Azide⁴⁷⁾ に於ける如く、廣く多くの酵素系を阻害するものは私の説の如く、防禦効果を放射線との併用に依り現わすが、他方その阻害作用が特に一定の酵素系に於て、他の一般的阻害よりも強い場合は、我々の Malonic acid; ワゴスチグミン、⁷⁾⁸⁾ 及び d-グルタミン酸¹⁰⁾ の如き拮抗的阻害剤の放射線との併用の如き増感効果を得るものであろう。

尚可逆性のない結合の場合、又は可逆的に戻し得るもの又は力のない場合も代謝拮抗剤との併用と同様に増感作用を得ている。

Covering Effect 自體が私の阻害剤とX線の併用に關する Hygothesis 中の“一般的に廣く多くの酵素系に阻害作用を示す阻害剤はその照射前投與に依り、X線の障害を減少せしめる”と云う説の證明の一つでもある。

この際照射中に於ても放射線作用に依り、基質等阻害剤に拮抗する物質の減少を來すので拮抗條件が阻害剤の作用に有利になる爲に Covering Eff-

ectを得る爲の投與方法としては、可逆的な阻害をSH基にするぎりぎりの濃度が最も効果的である事は先に述べた如くである。

以上酵母細胞に於て一般的に廣くSH基を可逆的に阻害する所謂 SH-Blocking Agents とX線の併用に就て、Covering Effect と云う機構の存する事を報告した。

この効果に就ては極めて最近に至り、Bacq⁴⁸⁾ も同様の事を想像している事を知つた。

又 Langendorff⁴⁹⁾ も最近、このSH-Blocker と放射線の併用に就て増感作用を期待してアロキサン、テトラチオン酸ソーダ等では増感作用を得ず、ヨード醋酸で之を得たと云う。

この實驗に就ては先に述べた如く其作用機構を論ずるに複雑な動物のしかも複雑な生死を Criteria としては解決困難である。

特に Reversibility に就て、又感受性、作用時間その排泄等々検討を要する。又濃度及び時間に關する私の考察が爲されなければならないと考へている。

5. 結 論

放射線障害を受け易いSH基、及び之を活性基としている蛋白質、酵素等に廣く特異的且可逆的な阻害作用を持つているアルキル化剤、酸化剤、メルカプチッド形成剤等は、之を照射前に投與する事に依り、之等反應性基を不活性化し、放射線の作用を受け難くし後、之が可逆的に回復して防護効果を示す云う機構即ち、Covering Effect が存するものゝ如くである。

終に終始御指導をいたゞき御校閲を賜つた 恩師氣賀教授に深甚の謝意を表すると共に種々協力下さつた小池氏佐藤氏島崎氏に感謝するものである。

尙本論文の要旨は第14回日本醫學放射線學會總會、昭和30年3月、關東部會其他で發表した。

文 獻

- 1) 氣賀、安藤、小池：放射線障害の回復に就て、昭28年總會發表。
- 2) 氣賀、安藤、小池：放射線障害の防禦と増感に就て、第14回總會發表。
- 3) 安藤、小池、他：放射線障害の回復に就て、第14回總會發表。
- 4) 安藤、小池、他：酵素阻害剤の照射前投與の酵母に及ぼす影響。昭和醫學會雜誌。

15巻, 3 號.—5) 小池: 酵母細胞に於ける放射線感受性と呼吸系の關係に就て。(印刷中). —6) 安藤: 他. 放射線障害の Co-enzyme factor に依る防護と回復に關する實驗的研究. 昭和醫學雜誌15巻3 號—7) Y. Andō, H. Koike et al: Combined Effects of Antitumor Subst. and Rad. III (Urethan)., in press. —8) M. Kiga, Y. Andō, et al: Sensitization of Rad. Effect I (Malonic acid). Science 122, 331, 1955. —9) M. Kiga, Y. Andō et al: Combined Effects of Antitumor Subst. and Rad. II (Nitromin) in press —10) Y. Andō. & M. Kiga., Sensitization of Rad. Effect. by d-Amino-acid I. d-Glutamic acid Science in press. —11) Risse, O.; Strahlentherapie. 34:581, 1929. —12) Risse, O., Z. Phys. Chem. A. 140:133, 1929. —13) Fricke. H: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2:241, 1934. —14) Weiss., J.: Nature 153:748, 1944. —15) Dale, W.M., Brit. J. Rad. 16:171, 1943. —16) Dale, W.M., Biochem. J. 45:543, 1949. —17) Barron, E.S.G. et al: J. Gen. Physiol., 32:537, 1949. —18) Barron, E.S.G. et al: J. Gen. Physiol., 33:229, 1950. —19) Barron, E.S.G. et al: J. Gen. Physiol., 32:595, 1949. —20) Barron, E.S.G. et al: J. Gen. Physiol., 32:179, 1948. —21) Patt, H.M. et al: Science 110:213, 1949. —22) Patt, H. M., et al: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73:13, 1950. —23) Hollaender, H., et al: Nature 167:103, 1951. —24) Bacq, Z.M. et al: Science 117:633, 1953. —25) Barron, E.S.G.: Symposium on Radiobiol. 216, 1952. —26) Greenberg, D.

M.: Chem. Pathway of Metab. V 1, 1954. —27) Sumner, J.B., The Enzymes. V 1 Part 1 1950. —28) E. Baldwin, B.A.: Dynamic Aspects of Biochem. 1952. —29) van Bekkum, D.W.: Brit. J. Rad 27, 127, 1954. —30) van Bekkum et al: Radiobiol. Symposium 201, 1955. Edit. Bacq and Alexander(1954). —31) Devik, F.: Brit. J. Rad. 25, 481, 1952. —32) Carbtree; Bacq, Patt, H.M. et al: Radiation Biol. V 1 Part II, 919, 1954. (Edit by Hollaender). —33) Friedman, et al: Brit. J. Pharmacol. 3:335, 1948. —34) 平出: SH の進歩 1954. —35) Barron & Singer: J. Biol. Chem. 157:221, 1945. —36) 安藤, 他: アミノ酸の防禦作用に就て(印刷中). —37) Barron, E.S.G. Radiation Biology V.1 p.1 Chap 5, 283, 1954. —38) Alexander, P.: Advances in Cancer Research (Ed. by. Greenstein & Haddow), 2, 1 1954. —39) Spoerl, E., et al: J. Biol. (Baltimore) 210:521, 1954. —40) Cori, et al: SH の進歩(平出)より, 59, (1954). —41) Alexander, P.: Fundamentals of Radiobiol. 190, 1955. (Ed. by. Bacq & Alexander). —42) Barron et al: J. Exp. Med, 87:489, 1948. —43) Griffiths. Arch. Biochem. 20:451, 1950. —44) Hopkins F.G., et al: Biochem. J. 32:1839, 1949—45) Patterson & Lazarow: J. Biol. Chem. 177:197, 1949. —46) 岡, 第32回日本生理學會總會發表: —47) Bacq, Z.M. et al: Brit. J. Rad. 24:61, 1950. —48) Bacq, Z.M. et al: Strahlentherapie 95:215, 1954. —49) Langendorff, H. et al: Strahlentherapie 95:535, 1954.

“On the Covering Effect against Radiation Damages”

By

Yoshio Ando

Department of Radiology, Showa Medical School, Tokyo, Japan.

I have been studying the combined effects of SH-blocking agents and radiation on yeast cells.

When alkylating agents, oxidizing agents or mercaptide forming agents were administered 40 min before irradiation, it was supposed that these agents would cooperate with radiation and the survivors would be decreased. But on the contrary, I obtained protective effect of those blockers against radiation damages.

Tab. 1~8. show the protective results by these treatment. And from my screening test, (to find out the attack point of anti-tumor substances or anti-metabolites, or to find out restorator to their increasing effect when they used prior to irradiation), SH-radicals

of cells are more specifically and universally inhibited than ether radicals (NH_2 , OH , etc.) in certain experimental conditions.

From above mentioned results, I would like to make a working hypothesis concerning to protective effect of these treatment: when alkylating agents, (Iodacetic acid, Nitromin), oxidizing agents, (Alloxan, Cystine) or mercaptide forming agents are administered in certain concentrations prior to X-irradiation, SH-radicals which exist in cells as whether in soluble forms, active centers of many enzymes or reactive groups of protein molecules, are covered and inactivated by these specific, universal and reversible inhibitors, and these SH-radicals suffer no damage during irradiation, and are able to recover after irradiation.

By X-irradiation, it will be occurred in cells that many substrates or competitive factors to inhibitors will be decreased by radiation damages, so the competitive inhibition of inhibitor will be predominant.

As a result, the inhibition may go further. And so it exist the optimal concentration which is notable to say very dilute, to obtain maximum covering effect.

To apply these results for mammals, it is necessary to use the specific inhibitor for SH-radicals which inhibit widely and reversibly them.