



Title	エックス線とアデノシン三磷酸 第2編 エックス線照射によるアデノシン三磷酸の変動
Author(s)	永井, 純
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1960, 20(1), p. 113-116
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20410
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

エックス線とアデノシン三磷酸

第2編 エックス線照射によるアデノシン 三磷酸の変動

札幌医科大学放射線医学教室（主任　牟田信義教授）

永　井　純

（昭和35年1月6日受付）

緒　　言

悪性腫瘍細胞中に含まれている酸溶性ヌクレオチドに対するエックス線の影響についてHevesy¹⁾, Forssberg and Klein²⁾其他色々の人の報告がある。又 Schmitz 等³⁾はしろねずみの Flexner Jobling tumor の酸溶性ヌクレオチドをカラムクロマトグラフィーにより分離し、グルコース-¹⁴C の各分画中の incorporation を経時的に検討している。著者は先に第一編⁴⁾に於いて、吉田腹水肉腫を移植したしろねずみの腹腔内にATPを注入し、その核分裂数を検討した結果、体外より注入したATPは腫瘍細胞の受け取るエックス線による障害に対して、防禦作用を有し、又障害の回復を促進する事を認めた。本編に於いては、エックス線を照射した場合、照射後短時間内に腫瘍細胞中に含まれるATP等の酸溶性ヌクレオチドはどの様な量的変動を来すのであろうかという疑問を解決せんとして実験を行つた。即ち、しろねずみに移植した吉田肉腫に対して、エックス線を照射し、吉田肉腫細胞中の酸溶性ヌクレオチドをカラムクロマトグラフィーにより分離し、特にATP, ADPの含有量の変化を観察した。

実験材料

当教室で飼育している体重120乃至160gmの東京系しろねずみを用い、当教室に於いて移植を続いている吉田皮下肉腫をしろねずみの両大腿部及び肩部に移植、移植後9乃至10日目、腫瘍の中止部に壞死を来すに至らない程度の大きさとなつ

た時に実験を行つた。

しろねずみの皮下腫瘍発生部以外の体部を鉛板で遮蔽しエックス線を照射した。照射条件は、管電圧200kV、管電流25mA、濾過板0.3mm Cu + 0.5 mm Al、焦点動物皮膚間距離40cm、線量率130.7r/min 照射線量は空気中線量1,000rである。照射後30分、1時間目にしろねずみをエーテル麻酔で殺し、動物死亡後直ちに腫瘍を摘出、ドライアイスエーテルで凍結後冷6%過塩素酸で抽出、その抽出液を定量分析の資料とした。尚対照として、非照射の群に就いても同様実験を行つた。使用した動物頭数は各群とも3頭のしろねずみを用い、同時照射、3頭からの腫瘍を一緒に集めて実験を行つた。

実験方法

1) 酸溶性ヌクレオチドの抽出法

ドライアイスエーテルで凍結した腫瘍組織を冷6%過塩素酸3~5容中でPotter-Elvehjemのホモジナイザーを用いホモジネートし、遠心分離して沈殿除去後、残渣を同じく2~3容の冷6%過塩素酸で洗滌し上清を合して、冷2N, KOHを用いて中和する。低温に保つて生じた沈殿を除去し、その上清全量約50mlを、蒸溜水で約2倍に稀釀して吸着の試料とした。以上の操作は、食塩を加えた氷塊により冷却し低温に保つたビーカー中で行つた。

2) 酸溶性ヌクレオチドの分離

イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーは宮

本⁵⁾の方法にヒントを得て行つた。200乃至400 mesh の Dowex-1 を長時間 1 N HCl 中に浮遊せしめ、時々液をとりかえてあらかじめ Cl 型としておいた。この樹脂をガラスのイオン交換樹脂塔中に流しこみ、1 cm²×19cm のカラムに作製した。カラムは蒸溜水で数回に亘り洗滌し、流出液中のイオン濃度は出来るだけ少さくしておいた。

1) に於いて得た過塩素酸抽出液をカラムに吸着せしめた後、樹脂の一倍量の蒸溜水で洗滌、後記する展開液を用い、1 分間 16.2 滴の流出速度で順次溶出した。分別はフラクションコレクターを用い、各試験管量は 12ml である。展開液は HCl-NaCl 系を用いたが、予め無機隣を除く意味で硼酸塩を用いた。即ち、0.01N K₂B₄O₇+0.025 M NH₄Cl, 0.005N HCl, 0.01N HCl, 0.01N HCl+0.04 M NaCl, 0.01N HCl+0.2 M NaCl の順に溶出した。

3) 各分別液の同定

島津分光電光度計 QB-50型を用い、各分別液の紫外部吸収を、波長 260mμ に於いて測定した。測定液槽は厚さ 1 cm の石英製キュベットを用いた。

クロマトグラムの上で吸収のピークを示す部分の前後 2 乃至 3 本のフラクションの分別液を集め、その試料に就いて同定を行つた。

先づ、その試料の紫外部吸収曲線を、pH 7.0 に於いて作製し、Beaven 等⁶⁾による紫外部吸収曲線と比較した。又 Schmitz 等によると E₂₇₅/E₂₆₀ はアデノシン 0.4, ウリジン 0.6, グアノシン 0.7 の値をとると報告しているので E₂₇₅/E₂₆₀ を求めた。以上 2 点よりこの試料中のヌクレオチドは大

体どのヌクレオチドに相当するかを想定した。次に、この想定に基き、各試料中のヌクレオチドの濃度を次式により計算して求めた。

$$A = E\lambda \cdot C \cdot d$$

こゝに A は試料中の 260mμ に於ける吸光度、C はモル濃度、d は測定液槽の厚さ、Eλ はその物質の測定波長に於ける吸光係数である。分子吸光係数は Bock 等⁷⁾により報告された値を用いた。

一方、試料中の 7 分隣を Lohmann 法⁸⁾により定量、この実測値と、上記方法により求めたヌクレオチドの濃度から計算される 7 分隣として定量される筈の隣の量を比較し、両値の略々一致すべきヌクレオチドを決定した。

実験結果

先づ非照射群に就いて各分別液の同定を行うと、第 1 表に示す如くなる。

フラクション番号 106, 107, 108 の分別液と一緒に集めた試料に於いては、最大吸収波長 259 mμ を有する紫外部吸収曲線を描き、E₂₇₅/E₂₆₀ 0.46, Lohmann 法により求めた 7 分隣の実測値 1.85 γ, このヌクレオチドは ATP であると想定して得た計算値より求めた 7 分隣 1.90 γ であつた。以上の結果よりこのヌクレオチドは ATP であると決定した。又、フラクション番号 62, 63, 64 の各分別液と一緒にした試料に於いては、最大吸収波長 259 mμ を有する紫外部吸収曲線を描き、E₂₇₅/E₂₆₀ 0.44, 7 分隣の実測値 1.82 γ, このヌクレオチドは ADP であると想定し計算して求めた 7 分隣の計算値は 1.83 γ であつた。以上の結果より ADP であると決定した。GDP, UDP に就いても同様同定した。しかし、AMP, GM

Table. 1 Identify of nucleotides.

Pooled fract. number	E ₂₆₀	Wave length at λ _{max} mμ	E ₂₇₅ /E ₂₆₀	7min P Lohmann γ	7 min P calculated γ	Identify
10. 11. 12.	1.215	257	0.44			AMP GMP
42. 43. 44.	0.414	262	0.68			UMP
62. 63. 64.	0.85	259	0.44	1.82	1.83	ADP
84. 85. 86.	0.165	259	0.7	0.89	0.86	GDP
102. 103.	0.146	261	0.67	0.87	0.91	UDP
106. 107. 108.	0.442	259	0.46	1.85	1.9	ATP

Fig. 1 Separation of acid-soluble mononucleotides of nonirradiated Yoshida sarcoma by anion exchange: exchanger, Dowex-1-chloride, 200-400 mesh, 19 cm × 1 cm², eluent, HCl + NaCl as shown, 16.2 drops/min, sorbed material, PCA extract from pooled frozen Yoshida subcutaneous sarcoma, weighting about 8.0g of 3 rats.

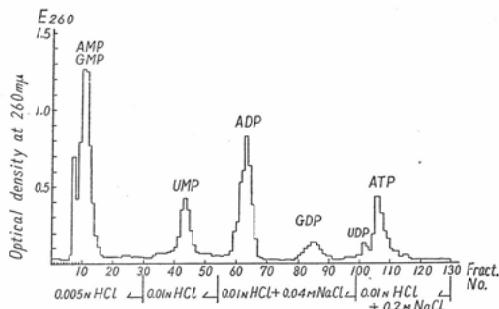
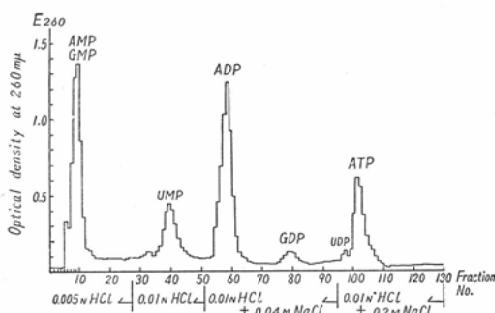
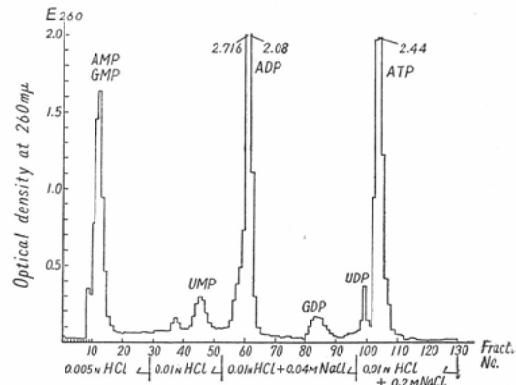


Fig. 2 Separation of acid-soluble mononucleotides of Yoshida sarcoma by anion exchange: exchanger, Dowex-1-chloride, 200-400 mesh, 19 cm × 1 cm², eluent, HCl + NaCl as shown, 16.2 drops/min, sorbed material, PCA extract from pooled frozen Yoshida subcutaneous sarcoma, weighting about 8.5 g of 3 rats at 30 min after X-irradiation.



P, UMPに就いては Lohmann 法を行つても意味がないので、Schmitz 等の発表したクロマトグラムを参考にして、最大吸収を示す波長、 E_{275}/E_{260} 及び吸収曲線の型より同定した。エックス線照射による酸溶性ヌクレオチドの含有量の変化は、第 1, 2, 3 図に示す如くなる。各フラクションの吸光度の中 ATP, ADP のフラクションは非照射群と比較して、照射後30分の群に於いて、ATP, ADP 共に高値を示す。又照射後1時間の群に於いては、ATP は殆んど変化を認め

Fig. 3 Separation of acid-soluble mononucleotides of Yoshida sarcoma by anion exchange: exchanger, Dowex-1-chloride, 200-400 mesh, 19 cm × 1 cm², eluent, HCl + NaCl as shown, 16.2 drops/min, sorbed material, PCA extract from pooled frozen Yoshida subcutaneous sarcoma, weighting about 7.0 g of 3 rats at 1 hour after X-irradiation.



ないが、ADP はかなり高値を示している。これに対し、他のフラクションは、照射により何の変動も来さない。又照射後特別に新たなフラクションも生じて来ない。

考 按

先に、Hevesy はマウスの腹水腫瘍を用い、エックス線 1,400r 全身照射した実験に於いて、腹水腫瘍細胞中の ATP 含有量は、照射前を 1 とすれば、照射30分後には 1.35 となり次いで減少し、照射後1時間30分に於いて正常値に戻ると報告している。又 Forssberg and Klein はエルリッヒ腹水腫瘍を用い、エックス線 1,250r 全身照射した結果、照射後35分に於いて、主として ATP より成る ATP-ADP フラクションが正常値の 25% 増加する事を報告している。今回著者はカラムクロマトグラフィーにより吉田肉腫の酸溶性ヌクレオチドを分離し、エックス線照射による変動を検討した結果、ATP, ADP のフラクションの吸光度は、対照と比べて、照射後30分の試料では ATP, ADP ともに高値を示し、照射後1時間の試料では ADP がかなり高値を示した。各フラクションの吸光度はそのフラクション中のヌクレオチドの濃度に比例するので照射後30分に於

いては、ATP, ADP共に著明に増量していると云える。これに対して、照射後1時間に於いては、ATPは殆んど変化が認められないが、ADPはかなり増加している事が認められた。しかしながら、この三群の材料は全部同量の材料を用いて実験を行ひ得た訳ではなく、又凍結直後の秤量も大凡の定量しか行ひ得なかつた為に、正確に腫瘍の単位グラム当りの定量を行うことは出来なかつたけれども、図から明かな如く、エックス線照射により、照射後30分に於いて、吉田肉腫中のATP, ADPの量はかなり増加すると考えられる。そしてこの結果は Hevesy, Forssberg and Klein 等の結果と一致した。このATPの量の変化と第一編に述べた ATPの防禦作用とを関係づける説明は今は見付からない。更に詳細にエックス線照射後のATPの変化を追求する必要がある。

又著者の行つた HCl-NaCl 系によるカラムクロマトグラムは、ギ酸—ギ酸アンモニウム系を用いて、しろねずみの Flexner Jobling tumor の酸溶性ヌクレオチドを分離した Schmitz 等のカラムクロマトグラムと、そのヌクレオチドの分離のされ方が類似していた。しかしながら、HCl-NaCl 系に比して、ギ酸—ギ酸アンモニウム系はより細い分離が可能であるが、著者の行わんとした。

X-ray and Adenosine triphosphoric acid Part II. Effect of X-irradiation on the acid soluble Nucleotides in the Yoshida Sarcoma Cell.

By

Jun Nagai

Department of Radiology, Sapporo Medical College
(Director: Prof. Nobuyoshi Muta)

At 30 minutes and one hour after X-irradiation of 1000r, the tumor tissues from 3 rats bearing Yoshida subcutaneous sarcoma were pooled and extracted with 6% perchloric acid. The acid soluble extracts were subjected to anion column chromatography (Dowex-1. 200-400 mesh).

From these experiments (Figs. 1, 2, 3), it is presumed as follows:

Since optical densities at 260 m μ of adenosine triphosphoric acid and adenosine diphosphoric acid extracted from the tumor cells at 30 minutes after X-irradiation were higher than those from the nonirradiated tumors, amounts of these nucleotides may increase in tumor cells after irradiation.

た、ATP, ADP, AMPの分離を主とする場合、HCl-NaCl 系で十分あると考えられる。

総 括

しろねずみに移植した吉田皮下肉腫に対して、エックス線 1,000r を照射し、吉田肉腫細胞中に含まれる酸溶性ヌクレオチドをカラムクロマトグラフィーにより分離した。

エックス線照射終了後30分に於いて、腫瘍細胞中のATP, ADPの含有量は著明に増量する事を認めた。

終りに臨み懇切なる御指導、御校閲戴いた本学生理学教室内田偉喜講師に深甚なる感謝の意を表す。

尚本論文の要旨は昭和34年第18回日本医学放射線学会総会に於いて報告した。

文 献

- 1) Hevesy, v. G.: Strahlenther. 93, 325—348, 1954. — 2) Forssberg, A. and Klein, G.: Exp. Cell Researc. 7, 480—497, 1954. — 3) Schmitz, H., Potter, V.R., Hurlbert, R.B. and White, D. M.: Cancer Researc. 14, 66, 1954. — 4) 永井: 未発表。 — 5) 宮本: 生化学, 30, 505—511, 1958. — 6) Beaven, G.H., Holiday, E.R. and Johnson, E.A.: The Nucleic acids, Chemistry and Biology. 1, 493, 1955. — 7) Bock, R. M., et al.: Arch. Biochem. Biophys. 62, 253, 1956. — 8) Lohmann, K. and Jendrasik, L.: Biochem. Z. 178, 419, 1926.