

Title	エックス線とアデノシン三リン酸 第2編 エックス線照射によるアデノシン三リン酸の変動
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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

エックス線とアデノシン三リン酸

第2編 エックス線照射によるアデノシン 三リン酸の変動

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 の各分割中への 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け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、腫瘍の中心部に壊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 照射線量は空气中線量 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。尙对照として、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、遠心分離して沈澱除去後、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澱を除去し、その上清全量約50ml を、蒸溜水で約2倍に稀釈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1N 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込み、1cm²×19cmのカラムに作製した。カラムは蒸留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小さくしておいた。

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、樹脂の十倍量の蒸留水で洗滌、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。分別はフラクシオ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、予め無機燐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

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

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本のフラクシオンの分別液を集め、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、この想定に基づき、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。

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

ここにAは試料中の260m μ に於ける吸光度、Cはモル濃度、dは測定液槽の厚さ、E λ 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分燐を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分燐として定量される管の燐の量を比較し、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。

フラクシオン番号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259m μ を有する紫外部吸収曲線を描き、E₂₇₅/E₂₆₀0.46、Lohmann法により求めた7分燐の実測値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分燐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、フラクシオン番号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259m μ を有する紫外部吸収曲線を描き、E₂₇₅/E₂₆₀0.44、7分燐の実測値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分燐の計算値は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} m μ	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, 19cm × 1cm², 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.

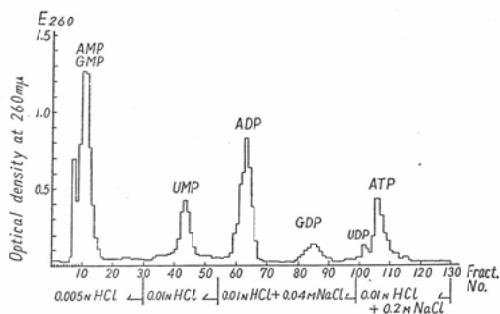
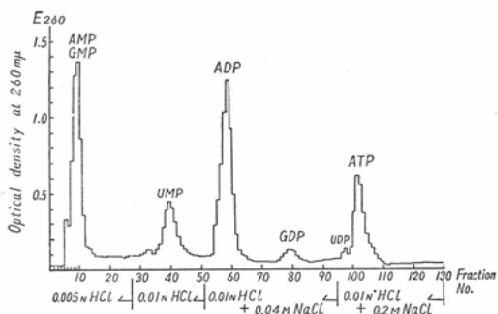
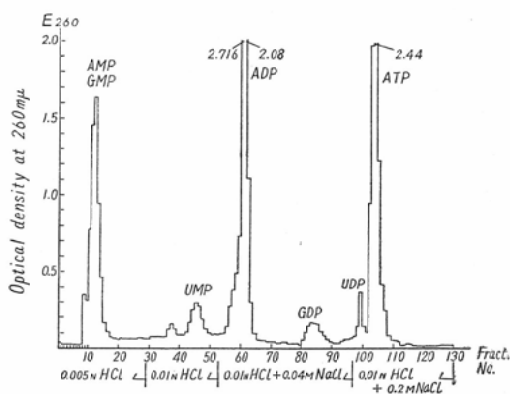


Fig. 2 Separation of acid-soluble mononucleotides of Yoshida sarcoma by anion exchange: exchanger, Dowex-1-chloride, 200-400 mesh, 19cm × 1cm², eluent, HCl + NaCl as shown, 16.2 drops/min, sorbed material, PCA extract from pooled frozen Yoshida subcutaneous sarcoma, weighting about 8.5 g of 3 rats at 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, 19cm × 1cm², 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 はエー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、AD
P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
て実験を行い得た訳ではなく、又凍結直後の秤量
も大凡の定量しか行い得なかつた為に、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A
TP, 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割した Schmitz 等のカ
ラムクロマトグラムと、そのヌクレオチドの分割
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
より細かい分割が可能であるが、著者の行わんとし

た、ATP, ADP, AMPの分割を主とする場
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
グラフィにより分割した。

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
教室内田倅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 Resarch. 7, 480—497, 1954. — 3) Schmitz, H., Potter, V.R., Hurlbert, R.B. and White, D. M.: Cancer Resarch. 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.

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.