612.015.14：577.153.3：547.963.3

血球及び組織細胞のATP-ase活性に関する生化学的並びに組織化学的研究

第　2　編

X線照射動物に於けるATP-ase活性について

岡山大学医学部病理学教室（指導：妹尾左知丸教授）

大　谷　恭　一　郎

〔昭和32年12月31日受稿〕

I. 緒　　言

一般にX線の照射により H_2O 分子は電離され OH, O_2H 及び H_2O_2 等の強力な酸化力を有する基を生ずる事は Weiss[1)2)] により明かにされている．この現象が生体内で行われる時，組織内或は細胞内の酸化され易い物質が変化を受けるであろう事は容易に想像される所であるが，Barron は特に生体内 SH 基が酸化を受ける事による変化を想定し[3)]，次いでこの真実性を実証している[4)5)]．即ちその活性を SH 基に依存する数種の酵素について実験を試み，これ等の活性がX線の照射により速かに阻碍されるが還元剤たる glutathione を添加すると阻碍を防止又は回復し得る事を見出したのである．この事実はX線のみならずβ線・γ線等の照射によつても確められている[6)]．又 Patt 等[7)] 及びChapman 等[8)] は cysteine や glutathione を注射する事により致死量のX線照射からラッテを保護し得た事を報告している．更にX線照射による細胞の有糸核分裂の抑制作用は他の SH 基作用物質たる sulfur mustard や nitrogen mustard 等によつても見られる所であり[9)]，細胞核のクロモゾームはその分子内に SH 基を含む[10)] 事と考え併せて，これもX線照射による SH 基酸化が重要な一因をなすものと思われる．

SH 基は生体内に可溶性の遊離状態又は蛋白の分子表面の基として広く存在し，生体の酸化還元過程に欠くべからざる重要な役割を果しているものであるが，上述の如き色々の事実から考えてX線照射の生体に及ぼす各種の影響の根本的な原因の一つとして SH 基阻碍の重要性を見逃す訳には行かない．私は前報に於て SH 酵素たる ATP-ase に関してその活性を追求し特異性その他に関し種々の知見を得たが[11)]，今回はX線照射動物に於ける ATP-ase 活性の変化を生化学的並びに組織化学的に検索して一定の成果を得たので報告する．

II. 実験材料及び方法

正常マウス及び家兎に致死量を上廻る2000γのX線を1回照射しその後の時間的経過を追つてマウスの肝・脾・心・腎及び家兎の末梢血・骨髄の ATP-ase 活性の変化をしらべた．照射装置は KXC 18型を用い，二次電流 25 mA，二次電圧 200 KVP，フィルター Cu 0.5 mm＋Al 0.5 mm，照射距離 30 cm とし毎分212γの強さで2000γを1回に全身照射した．

ATP は前報に於ける如く家兎及び犬の骨骼筋より Lohmann の方法[12)] を用いて抽出精製せるものを使用した．

生化学的方法に於ては Myosin ATP-ase 活性及び Mitochochondrial ATP ase 活性を別々に測定し，前者は Perry の方法[13)]，後者は Kielley の方法[14)]によつて行い，活性は何れも各臓器 100 mg 当りの遊離無機燐量で表わした．

組織化学的方法では組織の冷アセトン固定パラフィン切片及び冷フォルマリン固定凍結切片，末梢血のフォルマリンガス固定塗抹標本，骨髄の未固定スタンプ標本等を用いたが，その作製法は前報に述べた通りである．標準基質液及び cysteine 添加基質液の両方で反応を試みたが，その調製法や染色法も前報に詳述した通りで，対照として基質だけを全然加えない液で保温した切片も用意した．

III. 結　　果

1. 生化学的観察

肝に於て Myosin ATP-ase 活性は Fig. 1 に示

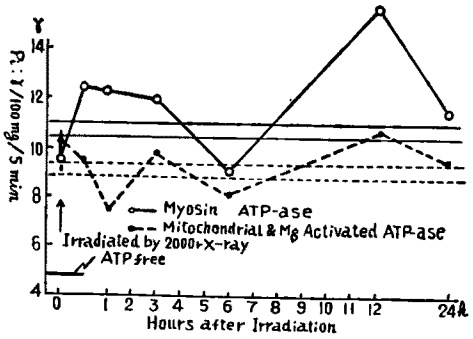


Fig. 1 ATP-ase Activity of Liver after X-ray Irradiation

註：平行な2本の実線は正常の myosin ATP-ase 活性値の範囲，2本の点線は mitochonbrial ATP-ase 活性値の範囲を示す．— ATP free は臓器固有の無機燐量．(Fig. 2 以下同じ)

す如く照射直後或程度の低下を来たすが，30分～3時間後では可成りの増加が認められる．6時間後では再び低下して最低の値を示すが12時間後には極めて著明な増加が見られ，それ以後は次第に減少するが，死亡直前の時期に於ても著明な減少は見られず，ほぼ正常に近い値を示している．Mitohcondrial ATP-ase 活性は照射直後却て僅かに増加し，Myosin ATP-ase より高値を示すすが，それ以後は減少し，常に後者より低値をとりつつ変動し後者の変動に先行する傾向を示す．

脾に於ても Fig. 2 の如く Myosin-ase 活性は，

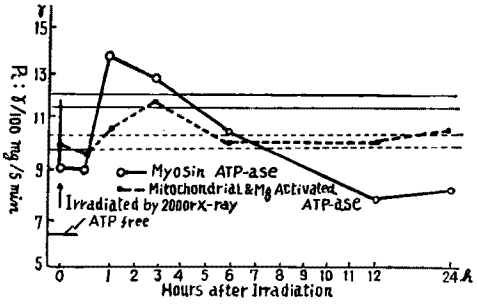


Fig. 2 ATP-ase Activity of Spleen after X-ray rrradiation

照射直後可成り減少し30分後も同じ低値をとるが，1～3時間後には肝と同様に増加し，6時間後及び12時間後では著明な減少を来す．その後は多少の変動はあるが次第に増加する傾向を示す．Mitochondrial ATP-ase 活性も大体これと一致した変動を示すが，Myosin ATP-ase より幾分低値るとる事が多く，又変動範囲も狭いのが特徴である．

心に於ては Fig. 3 に示す如くX線照射直後に於

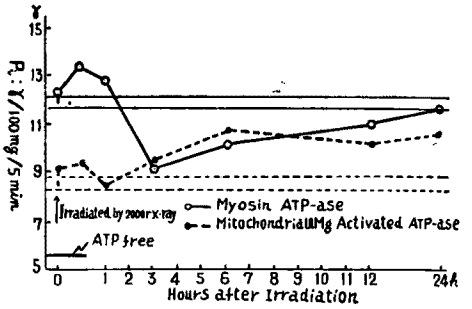


Fig. 3 ATP-ase Activity of Heart after X-ray Irradiation

て既に軽度の Myosin ATP-ase 活性の増加が見られ30分～1時間後も或程度増加した状態であるが，3時間後には肝や脾の場合と反対に著明な減少を来たしている．その後は次第に増量して正常値附近まで回復する．Mitochondrial ATP-ase 活性も殆んどこれと一致した変動を示すが変動範囲が狭く，且 Myosin ATP-ase の変動に明かに先行する波形を示している．

腎の Myosin ATP-ase 活性は Fig. 4 の如く

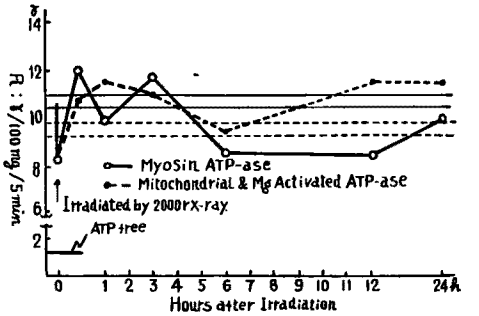


Fig. 4 ATP-ase Activity of Kidney after X-ray Irradiation

X線照射直後に著明な低下を示し30分後には既に正常値以上にまで回復している．3時間以後は再び下降して6時間～12時間後には可成り著しい低下を来たしているが，その後は徐々に回復の傾向があらわれる．Mitochondrial ATP-ase 活性は他の臓器に於けると同様 Myosin ATP-ase の変動によく似た波形を描いて変化し，且後者に先行する傾向が認められる．

末梢血に於いては Fig. 5 の如くX線照射直後から1時間後にかけて Myosin ATP-ase 活性の可成り著明な低下を来し，これは3時間後に回復し正常以上に増加するが，それ以後再び減少し正常値乃

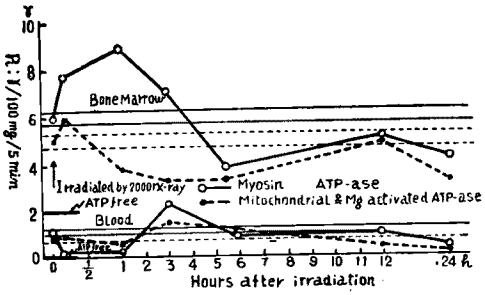


Fig. 5 ATP-ase Activity of Blood and Bone Marrow after X-ray Irradiation

至それ以下の値をとるようになる．Mitochondrial ATP-ase 活性は変動範囲はやや少いが，殆んどで同様の変化を示している．ここで面白い事はX線照射後の末梢血中の白血球数の増減をしらべると，放射前7,200前後あつたものが30分後6,750，1時間後2,750と減少し，3時間後には一時的に12,300と増加するが24時間後には1,800にまで減少していて，末梢血の ATP-ase活性の増減とほぼ一致した結果を示す事である．

骨髄では Fig. 5 でわかるように Myosin ATP-ase 活性は心に於けると同様，X線照射直後に却て著しい増加を示し，1時間後に最高値をとるが，その後次第に減少し6時間後には著明な低下を来す．それ以後は再び増加の傾向を見せ12時間後は正常値まで近づくのであるが，それ以後になると減少の一途を辿るに至る．Mitochondrial ATP-ase 活性は常にこれより低値をとりつつ明かに Myosin ATP-ase の変動に先行している．

2. 組織化学的方法

組織化学的方法に於ては一般にパラフィン切片による染色では，正常マウスとX線照射マウスとの間に極めて軽度の差異を見るに過ぎなかつたが，凍結切片では両者の間に相当明らかな差異を認める事が出来た．

中でも照射3時間後の心筋と12時間後の脾に於て最も著明な染色性の低下が認められた．即ち照射後3時間の心に於ては心筋線維の反応は著しく弱められており，これに反し間質の血管壁の黒染は極めて軽度に低下しているに過ぎない．この心筋の反応の低下は，基質液に cysteine を加える事により幾分回復するようであるが，照射前のものに比しなお相当弱められている(Plate Fig. 1, 2, 3).

照射後12時間の脾に於ては重量著しく減少して白血球系細胞の高度のを減少来し，リンパ濾胞も殆んど消失して細網細胞のみ目立つような状態にあるため，ATP を基質として組織化学的反応を行つても脾髄の細胞の反応は殆んど見られず，濾胞中心動脈その他の血管壁の黒染のみ著明に表われるに過ぎない (Plate Fig. 4).

肝に於ても照射後6時間の切片に於て実質細胞の反応に或程度の低下が認められ毛細胆管の染色は表われなくなつている．腎では矢張り照射後6時間のものに於て細尿管上皮細胞基底部の瀰漫性の反応がわづかに低下しているのが認められた．肝及び腎に於ても血管系の反応はX線照射により大して影響を受けない．

末梢血及び骨髄に於ては組織化学的に白血球系細胞のX線照射の減少は明かに認められるが，個々の細胞の胞体の黒染には極めて軽度な低下を見る程度で大した影響は及ぼさないようである．

興味ある所見として，基質を加えない液で反応させた肝・腎・心等の切片に於て，正常のものは肝実質細胞，腎細尿管上皮基底部，心筋線維等に自家基質による酵素反応と思われる極めて軽度な反応が表われるのに，照射後のこれ等臓器の切片に於てはかかる反応が常に全く見られなかつた (Plate Fig. 5, 6).

Ⅳ. 総括並びに考按

X線照射の生体に及ぼす影響の根本的な原因の一つが生体内 SH 基の阻碍である事は Barron[4)5)] を始め多くの人々により認められているが，私は今回の実験でその活性を SH 基に依存する ATP-ase に対してX線が果してどのような影響を及ぼすかを，生化学的並びに組織化学的に追求した．生化学的実験結果が示す如く，X線照射後の ATP 分解酵素の活性は，唯単なる低下を来すのではなく時間的に著明な変動を来す事が明らかになつた．前報[11)]に述べた如く ATP-分解酵素の複雑性から考えて，この時間的変動が SH 基活性の動揺のみによると即断は出来ないと思われるが，組織化学的に SH 酵素たる特異的 ATP-ase 活性に間違いないと思われる心筋線維の反応の消長がよく生化学的の変動と一致する事や，又 cysteine により幾分回復する事等の事実から判断して矢張りX線照射の SH 基への影響が主要な原因となつていると考えられる．末梢血及び骨髄以外の各臓器に於ては，2000γ照射後の活性の変動範囲はその臓器の正常活性値の大体30%内外であるが，これは各蔵器にはX線作用に対する或種

の抵抗が存するため，SH 酵素の阻碍程度は1000γの照射で全活性値の約12%に過ぎないという Barron[9] の知見と比較すると面白い結果である．末梢血，骨髄に於ては50%以上もの変動が見られるが，これは全活性値の低いためと白血球数の変動が激しいためとによるものと考えられる．Mitochondrial ATP-ase の変動が Myosin ATP-ase のそれに先行する如き傾向が認められる事については，この両者の間の何等かの特別の相関々係を示すのかも知れないが，現在の所では真の意味は不明という外はない．

前報に於てPCMBによる阻碍のみ表われcysteineによる賦活の明瞭でない第2群の反応に入れた肝実質細胞及び毛細胆管，腎細尿管上皮細胞基底部等の反応が SH 基を阻碍するX線照射により低下するという事は，この第2群の酵素を特異的 ATP-ase に加えるべきであろうという考えを一層強くする所見である．脾に於て照射後12時間の著明な ATP 分解酵素活性の低下は白血球系細胞の激減によるものである事はその組織化学的所見から容易に首肯し得る所である．パラフィン切片に於て腎細尿管上皮細胞刷子縁の反応は照射前後で殆んど変らないので前報第3群の Phosphomonoesterase の ATP 分解作用はX線による阻碍を受けないものと考えられる．更に第4群の血管壁や血球等の反応はX線照射によつても矢張り見るべき影響を受けない性質のものである事がわかつたのである．従つてこの第4群のものは SH 基をその活性基に有する ATP-ase とは全く別の酵素作用によるものと考えられる．最後に基質を加えない液で保温した肝・腎・心等の切片に於て正常のものとX線照射後のものとで明瞭な差異を生じたのであるが，正常組織に於けるこの種の反応は自家基質による酵素反応と考えられるもので，極めて軽度ではあるが，過量の基質を加えたいはば特種な状況下での反応と異り，最も生理的な状態に於る酵素活性の表現ともいうべきものある．かかる反応が SH 基依存性のものとすればX線照射により障碍されるのは当然で生体内の条件に最も近いものの表われとして興味深い所見である．

V. 結　　論

一般にX線照射は生体内の H_2O 分子を電離し $OH \cdot O_2H \cdot H_2O_2$ 等を生じこれによる酸化作用が SH 基をもつ酵素を阻碍するといわれている．私はこの観点からマウス及び家兎に大量のX線（2000γ）を1回に照射し，その後時間的経過を追つて肝・脾・心・腎・末梢血及び骨髄の ATP-ase 活性の変化をしらべた．

1） 生化学的検索では心筋及び骨髄以外のものの Myosin ATP-ase 活性は照射直後可成りの減少を示し，この2者では却つて増加している．照射後1～3時間で肝・脾・腎・末梢血の活性は次第に増加しこれに反して照射直後に増加した心筋・骨髄の活性は3～6時間後著明に低下している．その後肝・脾・腎・末梢血の活性は再び下降し照射後6～12時間で正常値以下を示したが，末梢血以外の3者はその後次第に増量し12～24時間後には正常値附近にかえつている．末梢血のみはこの最後の回復が見られない．心筋・骨髄は3～6時間で低下したが，その後次第に増量し12～24時間後ほぼ正常値にかえつているが，骨髄のみは12時間以後は次第に減少の一途を辿る．Mitochondrial ATP-ase の活性も Myosin ATP-ase と大体同様の変動を示すが，絶対値は後者に比し幾分低値を示し，又後者の変動に先行して変化する傾向を示す．

2） 組織化学的検索に於ても反応の強さは生化学的結果と大体一致した消長を示す．

a） 照射3時間後の心筋線維の反応は著しく減弱され，これは cysteine により幾分回復し得る．

b） 6時間後の肝実質細胞，毛細胆管及び腎細尿管上皮細胞基底部の反応は或程度低下し，これも SH 基依存性の特異的 ATP-ase 活性によるものと考えられる．

c） Phosphomonoesterase の ATP-分解作用はX線照射により見るべき影響を受けない．

d） 血管壁・血球等の反応は殆んどX線により障碍されない．

e） 照射12時間後の脾の著明な活性低下は，白血球系細胞の減少による．

3） 基質を加えない液で反応させた肝・腎・心等に於ては正常のものは自家基質による極めて軽度の反応を示すが，X線照射後は常にかかる反応は見られない．

稿を終るに当り，終始御指導と御校閲を賜つた恩師妹尾教授並びに小田助教授に深甚の謝意を表する．尚実験に当つては岡山大学放射線科学教室山本助教授，松島技師並びに第1生理学教室村上助手に多大の御援助を受けた事を深く感謝する．本研究は文部省科学研究費の援助による．

（本研究の要旨は日本病理学会第45回総会に於て報告した）

参 考 文 献

1) Weiss, J.: Nature, 153, 1944.
2) Weiss, J.: Nature, 157, 1946.
3) Barron, E. S. G.: U. S. Decument MDDC, 484, 1946.
4) Barron, E. S. G., Dickman, S., Muntz, J. A. & Singer, T. P.: J. Gen. Physiol., 32, 1949.
5) Barron, E. S. G. & Dickman, S.: J. Gen. Physiol., 32, 1949.
6) Barron, E. S. G. & Flood, V.: J. Gen. Physiol., 33, 1950.
7) Patt, H. M., Tyree, E. B., Straube, R. L. & Smith, D. E.: Science, 110, 1949.
8) Chapman, W. H., Sipe, C. R., Elizholtz, D. C., Cronkite, E. P. & Chambers, F. W.: Jr. Projekt NM 006012. 08. 25, Naval Medical Institute, Bethesda, Md., Sept., 1949.
9) Barron, E. S. G.: Advances in Enzymol., XI, 1951.
10) Davidson, J. N. & Lawrie, R. A.: Biochem. J., 43, 1948.
11) 大谷：岡山医学会誌，本巻，第1編.
12) Lohmann, H.: Biochem. Z., 202, 1929.
13) Perry, S. V.: Methods in Enzymol., 2, 1955.
14) Kielley, W. W.: Methods in Enzymol., 2, 1955.

写 真 説 明

Fig. 1. 正常心，冷中性フオルマリン固定凍結切片， ATP， 15分，
心筋線維及び間質血管壁に強い反応が見られる.

Fig. 2. 2000γ，照射後3時間の心，冷中性フオルマリン固定凍結切片， ATP， 15分，
心筋線維の反応は著しく弱められて居り，此れに反し間質血管壁の反応は殆ど影響されない.

Fig. 3. 2000γ，照射3時間の心，冷中性フオルマリン固定凍結切片， ATP＋Cysteine， 15分，
心筋線維の反応は幾分回復している．血管壁の反応は不変である.

Fig. 4. 2000γ，照射後12時間の脾，冷中性フオルマリン固定凍結切片， ATP， 30分，
脾の萎縮甚だしく脾髄の白血球系細胞の高度の減少のため，濾胞中心動脈その他の血管壁の反応のみ著明である.

Fig. 5. 正常肝，冷中性フオルマリン固定凍結切片， 基質なし， 30分，
肝実質細胞に極めて軽度ではあるが，自家基質による反応と考えられる着染が表われている.

Fig. 6. 2000γ，照射後6時間の肝，冷中性フオルマリン固定凍結切片， 基質なし， 30分，
肝実質細胞には殆ど何等の反応も見られない.

Biochmical and Histochemical Studies on ATP-ase Activities of Blood and Tissue Cells

Part 2.

Observations on the Animals irradiated with X-Ray

By

Kyohichiro OHTANI, M. D.

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Satimaru Seno)

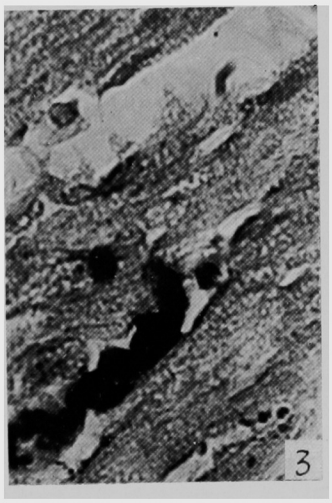
Generally it is accepted that X-ray irratiation in vivo, attacking H_2O molecules, produces OH, O_2H, H_2O_2 etc., and the oxydation invoked by these by-products inhibits the enzymatic activity of the SH group and others. Bearing this point in mind, changes of ATP-ase activities in the liver, spleen, heart, kidney, and peripheral blood as well as bone marrow have been examined along with the lapse of time in the rabbits irradiated with a quite substantial amount of X-ray irradiation, namely, 2,000γ each. Chemical estimation proved that myosin ATP-ase activities of cardiac muscle and bone marrow are increased immeadiately after irradiation while the activities of all other excepting these two are considerably reduced. The ATP-ase activities of the liver, spleen, kidney, and Peripheral blood increase gradually 1—3 hours after irradiation while on the contrary the activities of cardiac muscle and bone marrow are found to have decreased markedly 3—6 hours afterwards. Later on the activities of the liver, spleen, kindney and peripheral blood decrease again and after 6—12 hours they show the values below the normal, whereas after 12—24 hours, they recover close to the normal value excepting three cases in perihperal blood. The activities of cardiac mucle and bone marrow decrease for the first 3—6 hours but later increasing gradually, they recover almost to the normal 12—24 hours afterwards. However, after 12 hours the activity of bone marrow declining Gradually, continues its descent without ever recovering. Although the activity of mitochondrial ATP-ase behaves more or less in similar manner as that of myosin ATP-ase, its absolute value is lower than the latter observed at the same time and the former has a tendency to fluctuate prior to the latter.

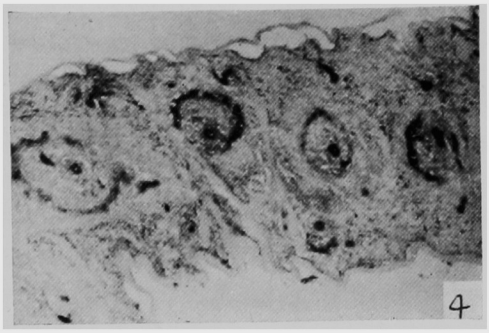
In histochemical observations the intensity of reactions fluctuates rather identically with the fluctuations observed in biochemical study. The reaction of cardiac muscle is markedly reduced for the first three hours after irradiation but it can be somewhat reactivated with cysteine. After six hours the reactions of liver parenchymal cells, biliary tubules, and basillar part of epithelial cells of renal urinary tubules decrease to a certain degree; and this decrease seems to be due to the true ATP-ase activities controlled by the SH group. The reaction of phosphomonoesterase like ATP-ase receiver no conceivable influence with X-ray irradiation. A decrease in the numbers of leukocytic cells is responsible for the striking reduction in the activity of the spleen 12 hours after irradiation. When the liver, kidney and heart in normal conditions are made to react in the absence of substrate, they show extremely slight reaction; whereas after X-ray irradiation, invariably they reveal no such reaction.

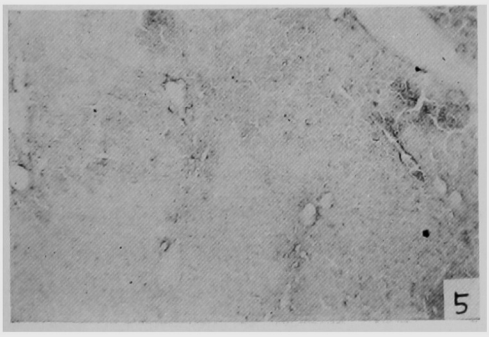
大谷論文附図

1

2


3


4


5

6